

Valtteri Walta

# Substraatin gradientin vaikutus leivinihiivan panos- nossyöttöprosessissa

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Insinööri (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Insinöörityö

26.5.2014

Tekijä Otsikko Sivumäärä Aika	Valtteri Walta Substraatin gradientin vaikutus leivinihiivan panossyöttöprosessissa 31 sivua + 24 liitettä 26.5.2014
Tutkinto	Insinööri (AMK)
Koulutusohjelma	Bio- ja elintarviketekniikka
Suuntautumisvaihtoehto	Biotekniikka
Ohjaaja	lehtori Mikko Halsas
<p>Työn tarkoituksena oli tutkia rajoittavan substraatin epähomogeenisen jakautumisen vaikutusta leivinihiivan panossyöttökasvatuksissa vertaamalla ideaalisesti sekoitettuja kasvatuksia ja epähomogeenistä jakautumista simuloivia tulppavirtauskasvatuksia online- ja offline-mittausten avulla. Kasvatukset tehtiin spesifisillä kasvunopeuksilla <math>0,15 \text{ h}^{-1}</math>, <math>0,20 \text{ h}^{-1}</math> ja <math>0,25 \text{ h}^{-1}</math>.</p> <p>Tulppavirtauskasvatuksissa solusaannot laskivat 14 %, 17 % ja 11 % verrattuna ideaalisesti sekoitettuihin kasvatuksiin. Koetoistojen puuttuessa tulosten tarkkuus jää arvailun varaan.</p> <p>Tulppavirtauksen toteutuksessa havaittiin vakavia puutteita, kun tulppavirrassa kuluneen substraatin määrän huomattiin olevan leivinihiivalle fysiologisesti mahdoton. Tulppavirrasta mitatut glukoosi- ja etanolipitoisuudet ovat siten vain suuntaa antavia. Reaktoriin ei missään kasvatuksissa kertynyt merkittäviä määriä glukoosia tai etanolia.</p> <p>Tehtiin myös vastaavasti accelerostat-kasvatukset, joissa kasvunopeutta nostettiin lineaarisesti <math>0,15 \text{ h}^{-1}</math>:sta <math>0,25 \text{ h}^{-1}</math>:n kasvatuksen aikana. Valitut parametrit eivät sopineet koejärjestelyyn, ja syöttösekvenssi oli laskettu virheellisesti. Kasvatukset eivät eronneet toisistaan merkittävästi mittaustulosten perusteella.</p>	
Avainsanat	panossyöttö, tulppavirtaus, accelerostat

Author Title Number of Pages Date	Valtteri Walta Influence of substrate gradient in fed-batch cultures of baker's yeast 31 pages + 24 appendices 26 May 2014
Degree	Bachelor of Engineering
Degree Programme	Biotechnology and Food Engineering
Specialisation option	Bio Sciences
Instructor	Mikko Halsas, Senior Lecturer
<p>The goal of this study was to examine the influence of inhomogeneous distribution of limiting substrate in fed-batch cultivations of baker's yeast by comparing ideally mixed cultivations to inhomogeneity simulating plug-flow cultivations by various online and offline measurements. Cultivations were carried out with specific growth rates of <math>0,15\text{ h}^{-1}</math>, <math>0,20\text{ h}^{-1}</math> and <math>0,25\text{ h}^{-1}</math>.</p> <p>Cell yields in the plug-flow cultivations were lowered by 14 %, 17 % and 11 % respectively. Without replicates the accuracy of the results is purely speculative.</p> <p>A serious flaw in the setup was found when the calculated substrate uptake during the plug-flow was discovered to be physiologically impossible for baker's yeast. Therefore the glucose and ethanol concentrations measured in the plug-flow are only indicative. There was no significant buildup of glucose or ethanol in the reactor in any of the cultivations.</p> <p>A pair of accelerostat cultivations were also conducted, in which the growth rate was steadily increased from <math>0,15\text{ h}^{-1}</math> to <math>0,25\text{ h}^{-1}</math>. The selected parameters did not work with the setup and the feed rate was calculated incorrectly. The cultivations did not differ significantly by any measurements.</p>	
Keywords	fed-batch, plug-flow, accelerostat

## Sisällys

1	Johdanto	1
2	Rajoittavien tekijöiden gradientit	2
2.1	Gradienttien synty	2
2.2	Glukoosiefekti	2
3	Panossyöttöprosessi	3
3.1	Panokasvatus	3
3.1.1	Viipymävaihe	3
3.1.2	Kiihtyvän kasvun vaihe	4
3.1.3	Eksponentiaalisen kasvun vaihe	4
3.1.4	Hidastuvan kasvun vaihe, stationäärivaihe ja kuolema	4
3.1.5	Toinen eksponentiaalisen kasvun vaihe	4
3.2	Syöttövaihe	5
4	Accelerostat	6
5	Kokeellinen osuus	6
5.1	Tulppavirtaus	7
5.2	Anturit	8
5.3	Kasvatualustat	8
5.3.1	Panoskasvatuksen alusta	10
5.3.2	Syöttöliuos	10
5.4	Hiiva	11
5.5	Koekasvatus	11
5.6	Panossyöttökasvatus	11
5.7	A-stat -kasvatus	12
5.8	Näytteet	13
5.8.1	Kuiva-aine määrittäminen	13
5.8.2	Entsymaattiset analyysit	14
6	Tulokset	14
6.1	Panoskasvatukset	14
6.2	Kasvu	14
6.3	Spesifinen kasvunopeus ja solusaanto	16

6.4	Online-mittaukset	18
6.5	Entsymbaattiset analyysit	21
6.5.1	Etanoli	21
6.5.2	Glukoosi	22
6.5.3	Glyseroli	23
6.6	A-stat	25
7	Virhelähteet	26
7.1	Koejärjestely	26
7.2	Online-mittaukset	26
7.3	Offline-mittaukset	27
7.3.1	Näytteenotto	27
7.3.2	Glyserolianalyysi	28
7.3.3	Glukoosi ja etanoli	28
7.4	A-stat	28
8	Korjausehdotuksia	29
8.1	Koejärjestely	29
8.2	Testit	29
9	Yhteenveto	30
	Lähteet	31
	Liitteet 1-24.	

## 1 Johdanto

Leiviniivaa (*Saccharomyces cerevisiae*) kasvatetaan tilavuudeltaan suurissa bioreaktoreissa, jotka ovat monen kasvua rajoittavan tekijän suhteen varsin dynaamisia kasvu ympäristöjä. Kasvu ympäristön vaihtelevat olosuhteet johtuvat muun muassa sekoituksesta ja lämpötilan säädöstä, jotka ovat merkittäviä kustannustekijöitä reaktorin ollessa riittävän suuri. Teollisessa mittakaavassa täydelliseen eli ideaaliseen sekoitukseen ei pyritä, sillä se olisi hinta-hyötysuhteeltaan kannattamatonta. Kasvuolosuhteiden vaihtelu vaikuttaa leiviniivan kasvuun, minkä lisäksi solut myös tuottavat yleensä ei-toivottuja aineenvaihduntatuotteita, kuten etanolia ja glyserolia. Vaikkei teollisuudessa pyritäkään ideaaliseen sekoitukseen, on yksittäisten tekijöiden vaikutusten tunteminen silti hyödyllistä; kun eri tekijöiden vaikutukset tunnetaan, voidaan prosessia optimoida yhden muuttujan suhteen kerrallaan. Tällaisten ilmiöiden tutkiminen teollisen mittakaavan reaktorissa on paitsi kallista myös epäkäytännöllistä, mistä syystä yksittäisten häiriötekijöiden vaikutusta pyritään tutkimaan pienessä mittakaavassa mahdollisimman kontrolloidussa ympäristössä.

Työ tehtiin Metropolian biotekniikan laboratoriossa osana Tekesin rahoittamaa Bio-Control-projektia. Tässä työssä pyrittiin rakentamaan substraatin suhteen hallitusti epähomogeeninen kasvu ympäristö liittämällä reaktoriin tulppavirtauskolonni ja vertaamaan saatua dataa vastaavalla kasvunopeudella toteutettuun ideaalisesti sekoitettuun kasvatukseen. Kokeita tehtiin kolmella spesifisellä kasvunopeudella ja kasvua rajoitettiin glukoosin syötöllä. Koska tutkittiin pelkästään glukoosin heterogeenisuuden vaikutusta kasvatukseen, olivat muut kasvuun vaikuttavat tekijät kuten lämpötila ja pH säädetty staattisiksi. Kasvatukset suoritettiin 15 litran bioreaktorissa kahdessa vaiheessa, ensin tuotettiin riittävästi solumassaa panoskasvatuksella, minkä jälkeen siirryttiin syötettyyn panoskasvatukseen.

Näiden lisäksi kokeiltiin, olisiko tarvittavan tiedon voinut saada kuuden erillisen kasvatuksen sijaan kahdella accelerostat-kasvatuksella. Accelerostat-kasvatuksessa spesifistä kasvunopeutta kasvatetaan lineaarisesti.

## 2 Rajoittavien tekijöiden gradientit

### 2.1 Gradienttien synty

Leiviniivaa kasvatetaan yleensä sekoitetuissa säiliöreaktoreissa (stirred tank reactor, STR). Teollisen mittakaavan reaktorit ovat yleensä tilavuudeltaan n. 100–200 m<sup>3</sup>. Näin suuret bioreaktorit eivät koskaan ole täydellisesti sekoitettuja, vaan eri aineet ovat jakautuneet reaktorissa spatiaalisesti. Täydellisesti sekoitetussa reaktorissa vallitsee kauttaaltaan täysin homogeeniset olosuhteet, mikä ei käytännössä ole mahdollista reaktorin tilavuuden ollessa tuotannollisesti mielekäs. Kasvuympäristön heterogeenisuuden syyt ovat paljolti kustannusteknisiä: suurten reaktorien sekoitus ja lämpötilan ylläpito kuluttavat merkittävästi energiaa. Hauraita soluja, kuten eläin- ja kasvisoluja, kasvatettaessa myös sekoituksen synnyttämät leikkausvoimat vaikuttavat solujen kasvukykyyn. [1, 2.]

On osoitettu, että suurissa reaktoreissa solujen substraatin saanti vaihtelee ylenmääräisestä lähes olemattomaan. Substraatin ja solumassan heterogeenisesta jakaantumisesta kasvatusalustassa johtuu epäsuorasti myös liuenneen hapen ja hiilidioksidin sekä pH:n gradientit. Jos solujen viipymä reaktorissa on pitkä, voi alueilla, joissa substraattipitoisuus ylittää saturaatioasteen, syntyä solujen aineenvaihdunnan takia paikallisesti happikatoa ja toisaalta ylenmäärän hiilidioksidia. Substraatin saannin vaihdellessa joutuvat solut jatkuvasti sopeuttamaan aineenvaihduntansa uusiin olosuhteisiin. *Saccharomyces cerevisiae* on osoitettu tuottavan etanolia glukoosipitoisuuden ollessa suurempi kuin n. 30 mg/l (Sonnleitner & Käppeli, 1986). Tätä ilmiötä kutsutaan glukoosiefektiksi tai Crabtree-ilmiöksi. [3.]

### 2.2 Glukoosiefekti

Glukoosipitoisuuden ollessa riittävän korkea Crabtree-positiiviset organismit, kuten leiviniiva, fermentoivat glukoosia aerobisesti. Hiivasolujen rajallinen soluhengityskapasiteetti aiheuttaa metabolisen pyruvaatin ylivuotoa. Kun hiivan kapasiteetti ei riitä käsittelemään pyruvaattia respiratiivisesti, se tuottaa siitä etanolia ja hiilidioksidia. Leiviniiva suosii respirofermentatiivista aineenvaihduntaa enemmän kuin respiratiivista. Syytä ilmiöön ei tiedetä, mutta on ehdotettu tämän olevan evoluution tuottama kilpailukykyä edistävä ominaisuus. [3.]

Solumassan kasvatuksessa eniten vaikutusta solusaantiin on rajoittavan substraatin, hapen, lämpötilan ja solumassan spatiaalisella, eli avaruudellisella jakautumisella reaktorin sisällä. Kasvua rajoittavien tekijöiden gradientit johtuvat mm. substraatin konsentraatiosta ja syöttöpisteestä. Substraattia kertyy usein verrattain paljon syöttöpisteen ympäristöön heikon sekoituksen ja liukenemisen takia. Usein substraatti syötetään reaktoriin päältä alueelle, jossa on yleensä myös verrattain tehoton, laminaarinen sekoitus. Jottei kasvatusalusta ei laimenisi liikaa fed-batch kasvatuksissa, syötetään substraatti reaktoriin yleensä varsin konsentroituna, glukoosin tapauksessa esimerkiksi pitoisuudessa 500 g/l. Tällöin väkevä syöttöliuos ei sekoitu kovin tehokkaasti kasvatusliuokseen ja onkin havaittu, että keskiarvoon verrattuna jopa 400-kertaisia substraattipitoisuuksia laminaarin syöttöpisteen lähellä. Rajoittavien tekijöiden gradientit ja näistä johtuva solujen jatkuva sopeutuminen uusiin olosuhteisiin vaikuttaa osaltaan solusaantiin. [4, 5.]

### **3 Panossyöttöprosessi**

Panossyöttöprosessit (engl. fed-batch) eli puolijatkuvat prosessit koostuvat panos- ja syöttövaiheista. Panosvaiheessa solumassa kasvatetaan haluttuun pitoisuuteen panoskasvatuksella ja syöttövaiheessa reaktoriin lisätään ravintoa. Leivinhiivakasvatukset ovat yleensä panossyöttöprosesseja. [3, 6.]

#### **3.1 Panokasvatus**

Panoskasvatuksessa kaikki raaka-aineet lisätään reaktoriin kerralla, minkä jälkeen prosessi etenee omalla painollaan haluttuun pisteeseen, esimerkiksi hiilenlähteiden loppumiseen. Panoskasvatuksissa reaktoriin ei lisätä ravinteita eikä kasvatusliuosta poisteta. Reaktoriin voidaan kuitenkin lisätä kaasuja, happoa ja emästä pH:n säätöön ja esimerkiksi vaahdonestoainetta. Panoskasvatuksen aikana solut käyvät läpi lukuisia eri kasvuvaiheita.[3, 6.]

##### **3.1.1 Viipymävaihe**

Panoskasvatus aloitetaan siirrostamalla solut steriiliin kasvuliuokseen. Soluilla kestää hetken tunnistaa ympäristönsä komponentit ja muokata aineenvaihduntansa näihin



sopivaksi. Tämä tarkoittaa käytännössä kasvatusalustan ravinteiden pilkkomiseen sopivien entsyymien ja ravinteita solun sisälle kuljettavien proteiinien muodostamista. Viipymävaiheen aikana solut eivät käytännössä kasva lainkaan. Viipymäajan pituus riippuu siitä, miten paljon uusi kasvuympäristö poikkeaa edellisestä esimerkiksi ravinteiden, happamuuden tai lämpötilan osalta. [3, 5.]

### 3.1.2 Kiihtyvän kasvun vaihe

Syntetisoituaan tarvittavat entsyymit ja ribosomit solut alkavat käyttää tarjolla olevaa ravintoa hyväkseen kasvaakseen ja jakautuakseen. Tässä vaiheessa solujen kasvua voidaan mallintaa yhtälöllä(1). [3, 6.]

$$\frac{dx}{dt} = \mu x$$

### 3.1.3 Eksponentiaalisen kasvun vaihe

Kun kaikki solut ovat alkaneet jakautua ja kasvaa ilman rajoitteita, ne ovat siirtyneet eksponentiaalisen kasvun vaiheeseen. Eksponentiaalista kasvua jatkuu käytännössä ravinteiden loppumiseen asti. Eksponentiaalisen kasvun aikana spesifinen kasvunopeus ( $\mu$ ) on käytännössä vakio, eli solut eivät pysty kyseisissä olosuhteissa kasvamaan nopeammin. Mittaamalla kasvunopeus eksponentiaalisen kasvun aikana saadaan määritettyä solujen kasvunopeuden maksimiarvo  $\mu_{\max}$  kyseisissä olosuhteissa. [3, 6]

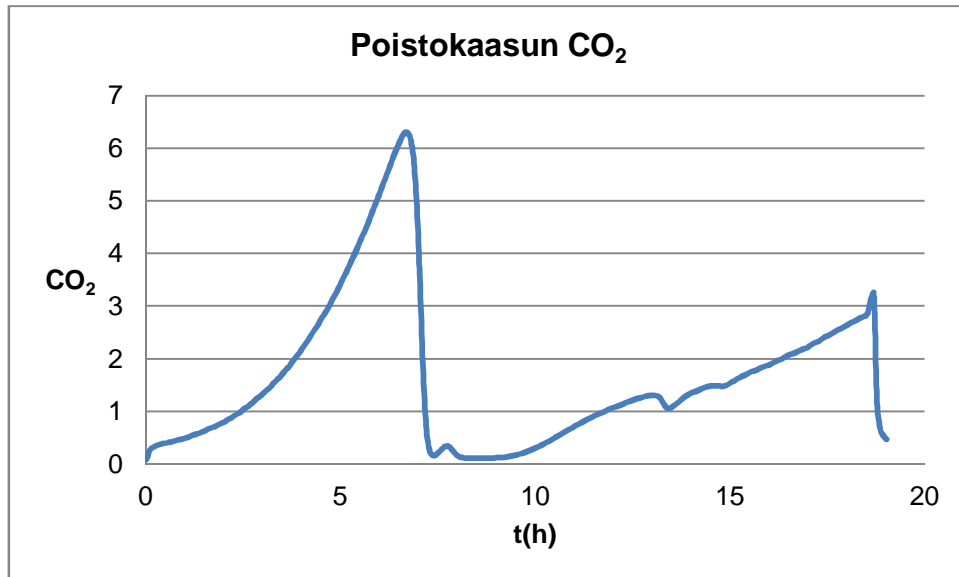
### 3.1.4 Hidastuvan kasvun vaihe, stationäärivaihe ja kuolema

Ravinteiden loputtua solujen kasvu lakkaa, ja solumassan määrä pysyy vakiona. Mikäli stationäärivaihe kestää riittävän kauan, alkavat solut kuolla ja autolysoitua eli hajota. [3, 6.]

### 3.1.5 Toinen eksponentiaalisen kasvun vaihe

Hiivasolujen panoskasvatuksissa ensimmäisen eksponentiaalisen kasvuvaiheen ja sitä seuraavan hidastuvan kasvun vaiheen jälkeen saattavat solut alkavat uudestaan kasvaa eksponentiaalisesti [6]. Ensimmäinen eksponentiaalivaihe loppuu rajoittavan sub-

straatin loputtua. Kasvatusalustaan on kuitenkin saattanut kertyä solujen tuottamia sekundäärituotteita, joita solut alkavat käyttää ravinnokseen. Kuvassa 1 on esitetty erään kasvatuksen panosvaiheen poistokaasun hiilidioksidipitoisuus ajan funktiona.



Kuva 1. Poistokaasun hiilidioksidipitoisuus ajan funktiona panoskasvatuksessa

Kuvassa näkyy, miten solut ovat ensin käyttäneet glukoosin loppuun tuottaen samalla solumassaa ja sekundäärituotteita. Glukoosin vähetessä kasvu ensin hidastuu ja sitten loppuu, mitä seuraavan viipymävaiheen jälkeen solut alkavat käyttää muita hiilenlähteitä. Kasvu ei sekundäärituotteilla ole yhtä nopeaa kuin glukoosilla. Kuvan panoskasvatuksessa ei alussa ole viipymävaihetta, sillä siirrosteen ja panoksen kasvatusalustat ja olosuhteet olivat varsin samanlaiset.

### 3.2 Syöttövaihe

Leiviniivaa kasvatettaessa päätuote on yleensä solumassa. Tällöin syöttövaiheessa reaktoriin lisätään ravinteita syöttönopeutta asteittain kasvattaen. Hallitulla syötöllä pyritään välttämään kasvua inhiboivia ilmiöitä, kuten glukoosiefektiä ja ylivuotomekanismia. Syöttönopeus ja sen muutos määritetään halutun spesifisen kasvunopeuden mukaisesti pyrkien siihen, että solut käyttäisivät kaiken ravinnon kasvuun. [4.]

## 4 Accelerostat

Accelerostat, eli a-stat, on tutkimuskäyttöön ja teollisten prosessien optimointiin kehitetty menetelmä, jossa kasvunopeuden muutosnopeus ( $a_\mu$ ,  $h^{-2}$ ) pidetään vakiona. Mikro-bien fysiologiaa tutkitaan yleensä jatkuvilla kasvatuksilla, joissa kaikki muuttujat pidetään vakioina. Tällöin jokaista kasvunopeutta vastaavat kasvatukset täytyy tehdä erikseen, mikä vie runsaasti aikaa ja resursseja. Onnistuessaan yksi a-stat-kasvatus vastaa useita vakio kasvunopeudella tehtyjä kasvatuksia. [7, 8.]

A-stat-kasvatuksissa muutosnopeuden optimointi on erittäin tärkeää: Kasvatuksissa pyritään pitämään muutosnopeus niin pienenä, etteivät mikrobit joudu jatkuvasti totuttelemaan liian dramaattiseen elinympäristön muutokseen, jolloin solujen sokkireaktio vaikuttaisi metaboliaan epätoivotulla tavalla. Muutosnopeus on kuitenkin pidettävä riittävän suurena, ettei solunsisäisten prosessien muutoksen tarkka tapahtumahetki hämähä. Mikäli etsittäisiin esimerkiksi leivinihiivan kriittistä kasvunopeutta liian hitaasti kiihtyvällä kasvunopeudella, tapahtuisi siirtymä respiratiivisesta respirofermentatiiviseen aineenvaihduntaan pitkällä aikavälillä, eikä tarkkaa kriittistä pistettä voitaisi määrittää. [7, 8.]

## 5 Kokeellinen osuus

Kasvatukset suoritettiin 15 litran bioreaktorilla (Sartorius, Bio-Stat DC-U 10-3), jonka käyttötilavuus oli 10 litraa. Työtä varten suoritettiin kasvatus kolmella eri kasvunopeudella. Lisäksi suoritettiin yksi accelerostat (a-stat) -kasvatus. Kasvatukset tehtiin sekä normaaleina panossyöttökasvatuksina että epähomogeenisuutta simuloivina tulppavirtauskasvatuksina. Tässä työssä reaktorin oletettiin olevan ideaalisesti sekoitettu eli kemiallisesti täysin homogeeninen.

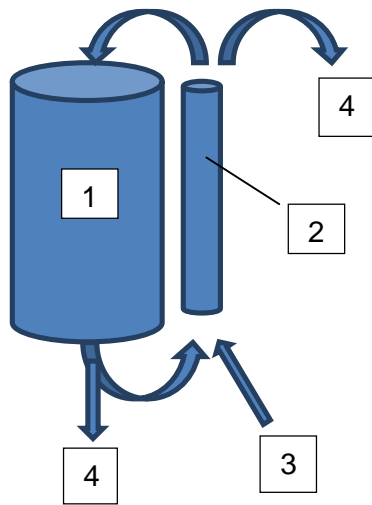
Kasvatuksissa pyrittiin korkeaan solusaantoon leivinihiivalle optimoidun alustan ja syöttöliuoksen valinnalla. Aiemmassa tutkimuksessa on havaittu, että leivinihiiva kuluttaa glukoosia täysin respiratiivisesti kasvunopeuden ollessa alle  $0,28 h^{-1}$  [4]. Spesifisiksi kasvunopeuksiksi valittiin  $0,15 h^{-1}$ ;  $0,2 h^{-1}$  ja  $0,25 h^{-1}$ . Näiden arveltiin vastaavan kohtalaisesti teollisen leivinihiivan tuoton vaatimuksia. Koekasvatuksella määritettiin solusaannoksi ( $Y_{x/s}$ ,  $g_{soluja}/g_{glukoosia}$ ) valitulla syöttöliuoksella  $0,5 g/g$ . Tässä työssä solumassaan viitattaessa tarkoitetaan solumassan painoa kuiva-aineena.

Kasvatustilämpötila oli 30 °C ja pH 5,0. pH:n säätöön käytetty ammoniakki (10 p-% ammoniumhydroksidi) toimi sekä emäksenä että typen lähteenä. Liuenneen hapen määrä pidettiin sekoituksen avulla 60 %:ssa alkuarvosta. niin kauan kuin sekoittimen kapasiteetti riitti, mutta kasvatuksen seuranta jatkettiin, kunnes liuenut happi laski 20 %:iin tai korkeintaan 8 tuntia. Liuenneen hapen laskiessa n. 20 %:iin ei prosessia voi pitää enää täysin respiratiivisena [4]. Tarvittaessa lisättiin hiukan vaahdonestoainetta (Struktol).

## 5.1 Tulppavirtaus

Tulppavirtaus toteutettiin liittämällä fermenttorin pohjaventtiiliin ja kannessa olevan yhteen väliin kolonni, jonka tilavuus oli 463,5 ml eli 5,5 % kasvatuksen kokonaistilavuudesta. Kasvatusliuosta pumpattiin 451 ml/min, jolloin liuoksen viipymäaika kolonnissa oli 62 sekuntia.

Viipymäaika määritettiin noin minuutiksi, koska solujen arvioitiin tässä ajassa ehtivän reagoida gradienttiin ja tuottaa mitattavia määriä sivutuotteita, mutta liuenneen hapen määrän alenemisen ei katsottu vaikuttavan liikaa. Tulppavirtauskasvatuksissa syöttö oli liitetty tulppavirtauskolonnin sisäänmenoon fermenttorin kannen sijasta. Syöttöletku oli kiinnitetty tulppavirtauskiertoon y-liittimellä. Tulppavirtaus kasvatuksissa näytteitä otettiin sekä reaktorin pohjasta että tulppavirtauksen yläpäästä. (Kuva 2).



Kuva 2. Tulppavirtauksen toteutus. Kuvassa esitetty: reaktori (1), tulppavirtauskolonni (2), syöttöpiste (3) ja näytteenottopisteet (4)

## 5.2 Anturit

Kasvatusten aikana online-antureilla seurattiin liuenneen hapen pitoisuutta, poistokaasun hiilidioksidin määrää sekä kasvuliuoksen pH-arvoa. Hiilidioksidi- ja pH-anturit kalibroitiin aina ennen kasvatusten alkua. Panoskasvatusten jälkeen liuenneen hapen mittausta säädettiin näyttämään arvoa 100 %; liuoksen oletettiin olevan siinä vaiheessa hapen suhteen kylläinen.

## 5.3 Kasvatualustat

Taulukoissa 1 ja 2 on esitetty vitamiini- ja hivenaineliuosten koostumukset, ja taulukossa 3 siirrosten ylöskasvatusalustan koostumus.

Taulukko 1. Hivenaineliuoksen koostumus

KOMPONENTTI	PITOISUUS g/l
EDTA	15
ZnSO <sub>4</sub>	5,75
MnCl <sub>2</sub>	0,32
CuSO <sub>4</sub>	0,5
CoCl <sub>2</sub>	0,47
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0,48
CaCl <sub>2</sub>	2,9
FeSO <sub>4</sub>	2,8

Taulukko 2. Vitamiiniliuoksen koostumus

KOMPONENTTI	PITOISUUS g/l
biotiini,	0,1
kalsium pantotenaatti	1,0
niasiini	1,0
myo-inositol	25,0
tiamiini hydrokloridi	1,0
pyrodoksiini-hydrokloridi	1,0
para-aminobenzoehappo	0,2

Taulukko 3. Ylöskasvatusalustan koostumus

KOMPONENTTI	PITOISUUS
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ,	10,0 g/l
MgSO <sub>4</sub> ,	2,5 g/l
glukoosi	25 g/l
urea	3,0 g/l
hivenaineliuos	10 ml/l
vitamiiniliuos	3,0 ml/l

Kasvatusalustan valmistaminen aloitettiin sekoittamalla ensin hivenaine- ja vitamiiniliuokset. Hivenaineliuos steriloitiin muun alustan mukana autoklaavissa ja vitamiiniliuos steriilisuodatettiin kasvatusalustaan lisättäessä.

Alusta steriloitiin autoklaavissa 20 minuuttia 121 °C:ssa, minkä jälkeen siihen lisättiin steriilisuodatettua ureaa ja vitamiiniliuosta pitoisuuksiin 3 g/l ja 10ml/l sekä 5 ml hiivaliuosta. Siirrostet kasvatettiin 1000 ml:n erlenmeyerpulloissa, joissa oli 500 ml kasvatusliuosta. Kasvatusolosuhteet olivat 30 °C, sekoitus 200 rpm ja kasvatusaika 24 h.

### 5.3.1 Panoskasvatuksen alusta

Alustan tilavuus siirroste mukaan laskettuna oli 8,5 l.

Taulukko 4. Alustan koostumus

KOMPONENTTI	PITOISUUS
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	15 g/l
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	8,0 g/l
$\text{MgSO}_4$	3,0 g/l
hivenaineliuos	10 ml/l
$\text{ZnSO}_4$	0,4 g/l
glukoosi	12,5 g/l
vitamiiniliuos	12 ml/l

Panoksen kasvatusalusta steriloitiin reaktorissa ennen vitamiiniliuoksen lisäystä.

### 5.3.2 Syöttöliuos

Syöttöliuos valmistettiin liuottamalla ensin glukoosi lämpimään veteen, minkä jälkeen liuokseen lisättiin muut aineet imupullosuodatuksen avulla hivenainesakan poistamiseksi.

Taulukko 5. Syöttöliuoksen koostumus:

KOMPONENTTI	PITOISUUS
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	9,0 g/l
$\text{MgSO}_4$	2,5 g/l
$\text{K}_2\text{SO}_4$	3,5 g/l
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	0,28 g/l
glukoosi	500 g/l
hivenaineliuos	10 ml/l
vitamiiniliuos	12 ml/l

Liuos pumpattiin reaktoriin steriilisuodattimen läpi.

#### 5.4 Hiiva

Työssä käytettiin tavallisesta kaupan hiivapaketista (Suomen Hiiva Oy) kasvatusmaljal-  
le eristettyä kantaa. Kasvatusmaljalta siirretyt solut ylöskasvatettiin ravistelussa kah-  
dessa 500 ml erlenmeyerpullossa 250 ml liuosta kussakin. Kasvatusalustan koostumus  
oli sama kuin siirrosteiden kasvatuksissa. Kasvatusaika oli 30 °C:ssa 200 rpm nopeu-  
della n. 2 vuorokautta, minkä jälkeen siirrosteet pipetoitiin steriileihin 5 ml:n muoviput-  
kiin ja pakastettiin.

#### 5.5 Koekasvatus

Työ aloitettiin suorittamalla koekasvatus, jonka avulla testattiin suunniteltujen reseptien  
ja parametrien toimivuutta. Kasvatuksen lopussa otetuista näytteistä määritettiin hiivan  
kuiva-aine pitoisuuden (g/l) ja sameuden eli optisen tiheyden ( $\text{OD}_{600}$ ) välinen suhde.  
Saadun tiedon avulla hahmoteltiin myös syöttöprofiili varsinaisia kasvatuksia varten.  
Kokeen avulla saatiin myös määritettyä mielekäs glukoosimäärä panoskasvatusta var-  
ten sekä todennettua suunniteltujen näytteenottomenetelmien toimivuus.

#### 5.6 Panossyöttökasvatus

pH säädettiin arvoon 5 ja puskurialueeksi asetettiin 0,25. pH:n säätökemikaalit olivat 10  
p-%  $\text{NH}_4\text{OH}$  ja 30 p-%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . Sekoituksella säädettävän liuenneen hapen minimiar-



voksi asetettiin 60 % lähtöarvosta. Panoksen hiilenlähteet oli kulutettu loppuun noin 16 tunnin kuluttua siirrostuksesta, mikä todettiin hiilidioksidin tuotannon loppumisesta.

Panoksen hiilenlähteiden kuluttua loppuun alustasta otettiin näyte, joka laimennettiin 1:100, minkä jälkeen mitattiin näytteiden OD<sub>600</sub>. Koekasvatuksen yhteydessä havaittiin liuoksen kuiva-ainepitoisuuden ja OD<sub>600</sub>:n suhteen olevan melko tarkkaan 0,35 (OD<sub>600</sub> · 0,35 = g<sub>soluja</sub> /l). Tätä käytettiin määrittäessä solumassa panoskasvatuksen lopussa, jotta voitiin laskea syöttöprofiili mahdollisimman tarkasti.

Kasvatuksia varten käytettävä eksponentiaalinen syöttö saatiin yhtälöstä (3)

$$F_s = \left( \frac{\mu}{Y_{X/S}} \right) \cdot \left( \frac{C_{X(0)} \cdot V_0}{C_S} \right) \cdot e^{\mu t}$$

Yhtälössä (3)  $F_s$  on ravintoliuoksen syöttönopeus (l/h),  $\mu$  on spesifinen kasvunopeus ( $h^{-1}$ ),  $Y_{X/S}$  on solusaanto (g<sub>soluja</sub>/g<sub>substraattia</sub>),  $C_{X(0)}$  solukonsentraatio panoskasvatuksen lopussa (g/l),  $V_0$  on kokonaistilavuus alussa (l) ja  $C_S$  on ravintoliuoksen glukoosikonsentraatio (g/l).

### 5.7 A-stat -kasvatus

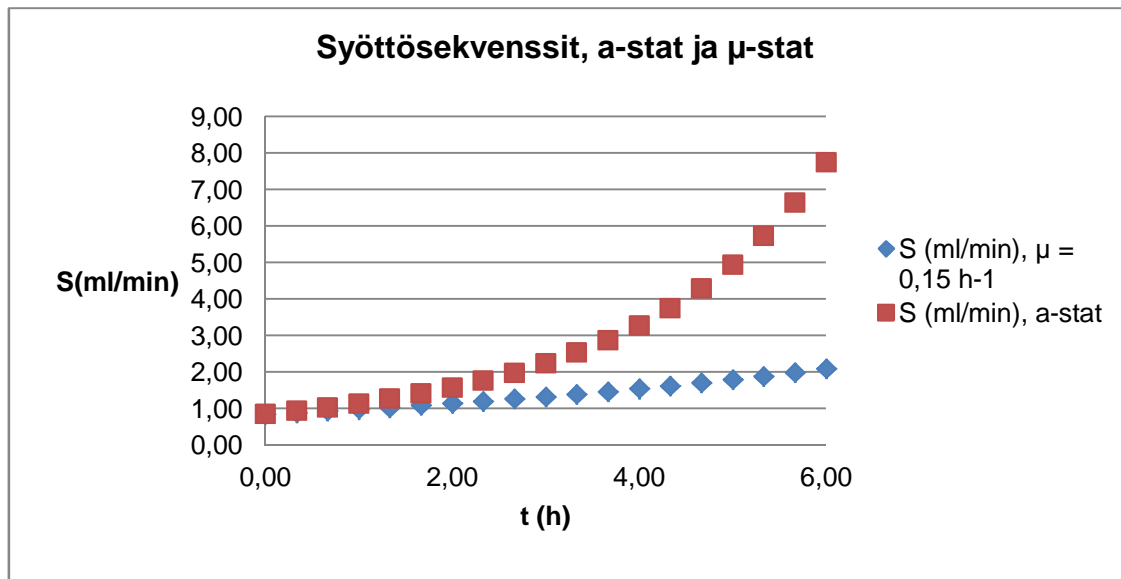
Kasvatukset aloitettiin kasvunopeudella 0,15  $h^{-1}$  ja kasvunopeuden muutosnopeus määritettiin 0,02  $h^{-2}$ :en. Ajan funktiona kasvava kasvunopeus laskettiin 20 minuutin intervalein kuten yhtälössä (4) esitetään

$$\mu(t) = \mu(0) + a\mu \cdot t$$

Syöttönopeus laskettiin ajanhetkestä riippuvan kasvunopeuden mukaan 20 minuutin välein yhtälön (5) mukaisesti.

$$F_s = \left( \frac{\mu(t)}{Y_{X/S}} \right) \cdot \left( \frac{C_{X(0)} \cdot V_0}{C_S} \right) \cdot e^{\mu(t)t}$$

Näin laskettu syöttönopeus kasvaa eksponentiaalisesti (Kuva 3).



Kuva 3. Kuvassa on esitetty a-stat ja  $\mu$ -stat syöttösekvenssit ajan funktiona

Molemmat syöttösekvenssit ovat eksponentiaalisia, mutta a-stat-kasvatuksen käyrä on nousevasta kasvunopeudesta johtuen huomattavasti jyrkempi. Tämä johtuu syöttösekvenssin laskuun käytettyyn taulukkoon tehdystä kiusallisesta virheestä, joka aiheuttaa syöttönopeuden liian jyrkän kasvun. Virhe huomattiin liian myöhään.

## 5.8 Näytteet

Solujen kasvua seurattiin valitusta kasvunopeudesta riippuen tunnin tai puolen tunnin välein mittaamalla 1:100 laimennetun liuoksen optinen tiheys aallonpituudella 600 nm sekä suorittamalla kuiva-aine määritys kasvatuksen alussa, keskivaiheessa ja lopussa. Kaikki offlinemittaustulokset löytyvät liitteistä 4-8.

### 5.8.1 Kuiva-aine määritys

Kolmeen koeputkeen pipetoitiin 5 ml näytettä kuhunkin. Näytteet sekoitettiin koeputkisekoittimella huolellisesti, minkä jälkeen niitä sentrifugoitiin 5 minuuttia kierrosnopeudella 5000 rpm. Tämän jälkeen koeputkista kaadettiin varovasti pois mahdollisimman paljon nestettä, minkä jälkeen putkiin pipetoitiin 5 ml tislattua vettä ja sykli toistettiin kaksi kertaa. Lopuksi näytteet siirrettiin taaratuille alumiinivuoille tislattulla vedellä huuhtoen ja niitä kuivattiin 105 °C:ssa 15–20 tuntia. Kuivauksen jälkeen näytteitä jäähdytettiin eksikkaattorissa vähintään 2 tuntia.

A-stat kasvatuksessa todellisen kasvunopeuden seurannan oli oltava tarkempaa, joten kuiva-ainepitoisuutta mitattiin puolen tunnin välein. Kuivapainonmääritykseen käytettiin kirjallisuudesta löydettyä tekniikkaa: kaksi 5 ml:n näytettä suodatettiin kuivattujen ja taarattujen lasikuitusuodattimien (läpäisy  $0,6\ \mu\text{m}$ ) läpi ja huudeltiin runsaalla vedellä. Näytteistä mitattiin myös optinen tiheys aallonpituudella 600 nm. [9]

### 5.8.2 Entsymaattiset analyysit

Kuivapainon lisäksi seurattiin etanoli-, glyseroli- ja glukoosipitoisuuksia offline-mittauksina. Nämä tehtiin, spesifisestä kasvunopeudesta riippuen, joko tunnin tai puolen tunnin välein otetuista näytteistä, jotka steriilisuodatettiin välittömästi näytteenoton jälkeen solumassan poistamiseksi ja siirrettiin  $-18\ ^\circ\text{C}$ :een pakastimeen. Määritykset suoritettiin entsyymaattisilla testikiteillä (Enzymatic BioAnalysis, Roche). Näytteet analysoitiin kahden viikon kuluessa näytteenotosta. Myös asetaattipitoisuutta seurattiin, mutta asetaatin määrä ei missään kasvatuksessa ylittänyt testikitin ilmoittamaa alarajaa.

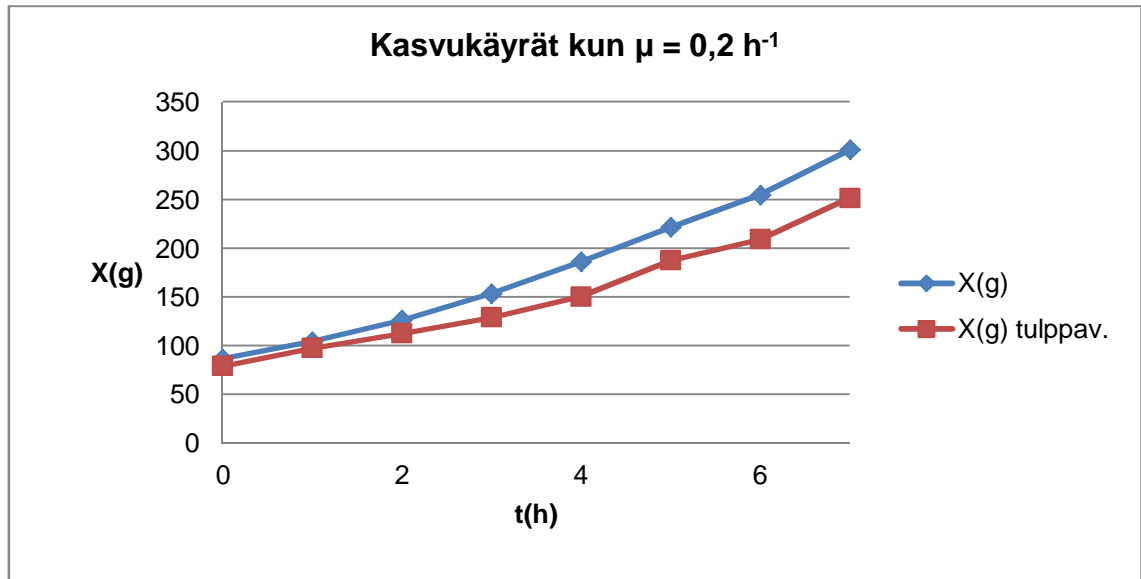
## 6 Tulokset

### 6.1 Panoskasvatukset

Panoskasvatukset onnistuivat hyvin ja kasvukäyrät kasvatusten aikana vastasivat koe-kasvatuksen asettamia odotuksia. Solumassan kokonaismäärä panoskasvatusten lopussa oli noin 80–100 grammaa.

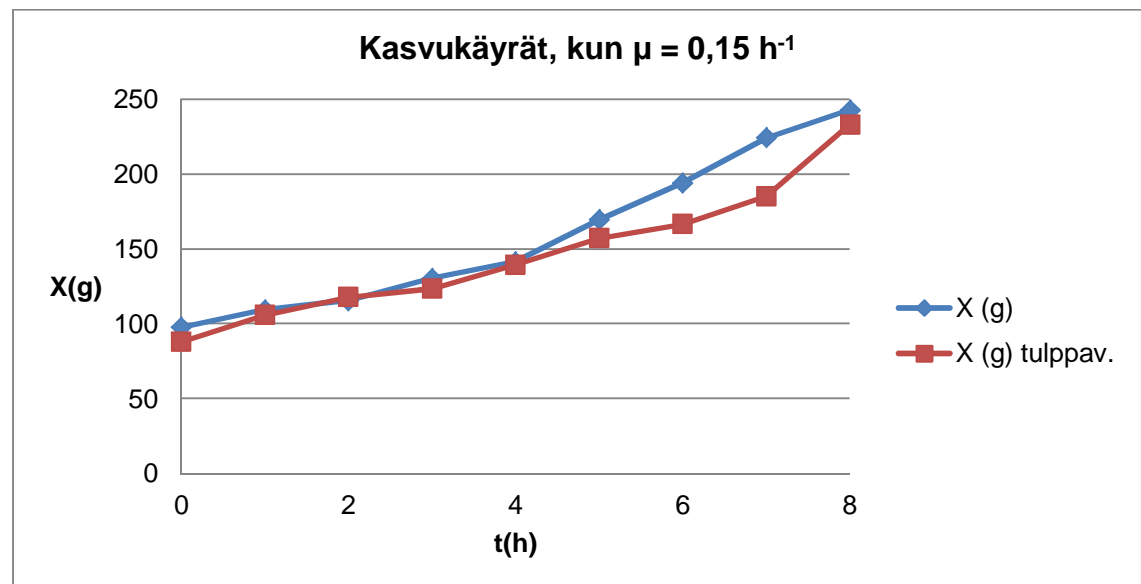
### 6.2 Kasvu

Viitteellistä solumassan määrää seurattiin  $\text{OD}_{600}$  määrityksellä tunnin tai puolen tunnin välein halutusta kasvunopeudesta riippuen. Kuvassa 4 on verrattu kasvukäyriä ideaalisesti sekoitetun ja tulppavirtauskasvatuksen välillä kun  $\mu = 0,2\ \text{h}^{-1}$ .



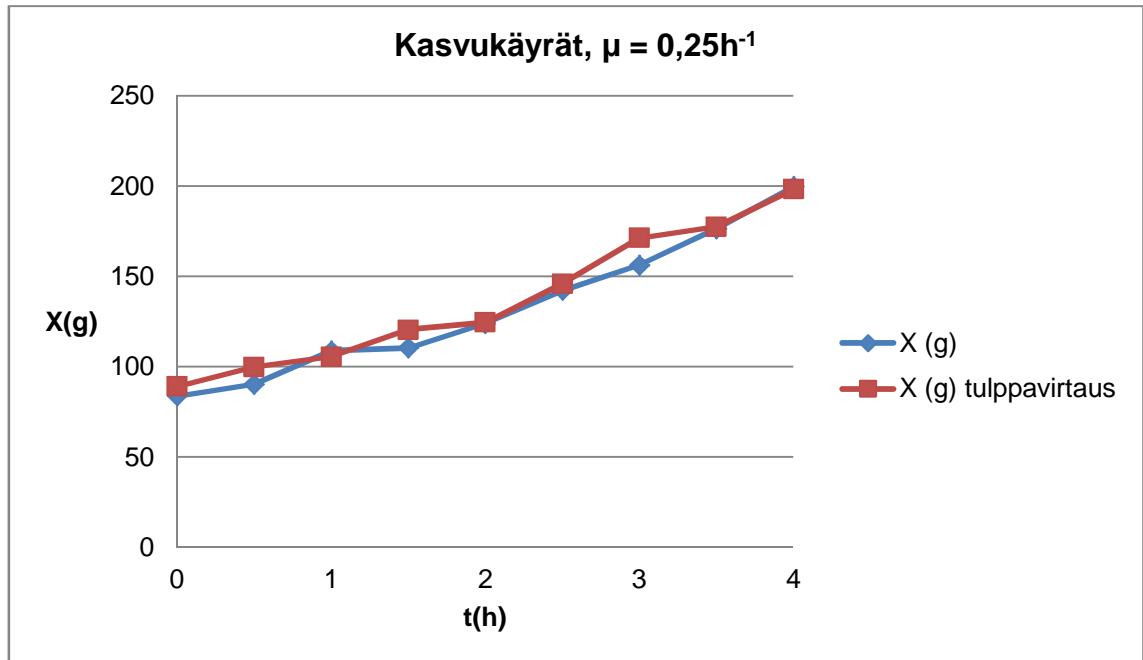
Kuva 4. Solumassat ajan funktiona, kun  $\mu = 0,2 \text{ h}^{-1}$ .

Kuvasta näkyy kasvatuksia vertailemalla havaittu kasvunopeuden hidastuminen tulpavirtauskasvatuksessa. Kyseisellä kasvunopeudella toteutetut kasvatukset olivat ai-noat, joiden välillä oli selkeä ero solumassan kasvua verrattaessa. Kuvassa 5 on esitetty vastaavat kasvukäyrät kun  $\mu = 0,15 \text{ h}^{-1}$



Kuva 5. Kokonaissolumassat ajan funktion kun  $\mu = 0,15 \text{ h}^{-1}$

Kuvan perusteella substraatin gradientin vaikutusta ei solumassan kasvun perusteella voi havaita. Myöskään kasvatuksissa, joissa kasvunopeus oli  $0,25 \text{ h}^{-1}$  ei havaittu merkittävää eroa solumassan kasvua seuraamalla (Kuva 6).



Kuva 6. Kokonaissolumassat ajan funktiona kun  $\mu = 0,25 \text{ h}^{-1}$

Kuvassa näkyy, että kasvatukset etenivät alusta loppuun hyvin samanlaisina. eikä tulppavirtauskasvatusta ja ideaalisesti sekoitettua kasvatusta pysty solumassan kasvun perusteella erottamaan toisistaan.

### 6.3 Spesifinen kasvunopeus ja solusaanto

Spesifinen kasvunopeus ja solusaanto määritettiin kuivapainoanalyysien perusteella kasvatusten jälkeen. Määrittämiseen käytettiin kasvatukseen alussa ja lopussa otettuja näytteitä. Spesifinen kasvunopeus  $\mu$  määritettiin yhtälöllä 4

$$\mu = \frac{\ln\left(\frac{X_n}{X_0}\right)}{n}$$

ja solusaanto  $Y_{x/s}$  yhtälöllä 5

$$Y_{x/s} = \frac{\Delta X}{\Delta S}$$

Taulukossa 6 on esitetty kasvunopeuden ja solusaannon asetusravojen toteutuminen kaikissa kasvatuksissa.

Taulukko 6. Asetetut ja todelliset kasvunopeudet sekä solusaannot kasvatuksissa.

Asetusravot		Todelliset arvot	
$\mu$	$Y(x/s)$	$\mu$	$Y(x/s)$
0,15	0,50	0,149	0,498
0,20	0,50	0,191	0,450
0,25	0,50	0,227	0,459
Tulppavirtauskasvatukset:			
Asetusravot		Todelliset arvot	
$\mu$	$Y(x/s)$	$\mu$	$Y(x/s)$
0,15	0,50	0,128	0,429
0,20	0,50	0,166	0,372
0,25	0,50	0,224	0,408

Molemmat arvot olivat kaikissa tulppavirtauskasvatuksissa kasvatuksissa pienemmät kuin vastaavissa ideaalisesti sekoitetuissa kasvatuksissa, joskin koetoistojen puuttuessa havaintojen tarkkuus ja merkittävyys jäi arvailun varaan.

Taulukosta voidaan myös huomata todellisen kasvunopeuden ja solusaannon vastaavan asetusravoa varsin hyvin, kun spesifiseksi kasvunopeudeksi oli määritetty  $0,15 \text{ h}^{-1}$ . Kasvunopeutta nostettaessa solut eivät ilmeisesti pysyneet mukana vauhdissa. Kasvunopeuden ollessa  $0,25 \text{ h}^{-1}$  molemmat arvot heittelivät paljon koko kasvatuksen läpi (Taulukko 7)

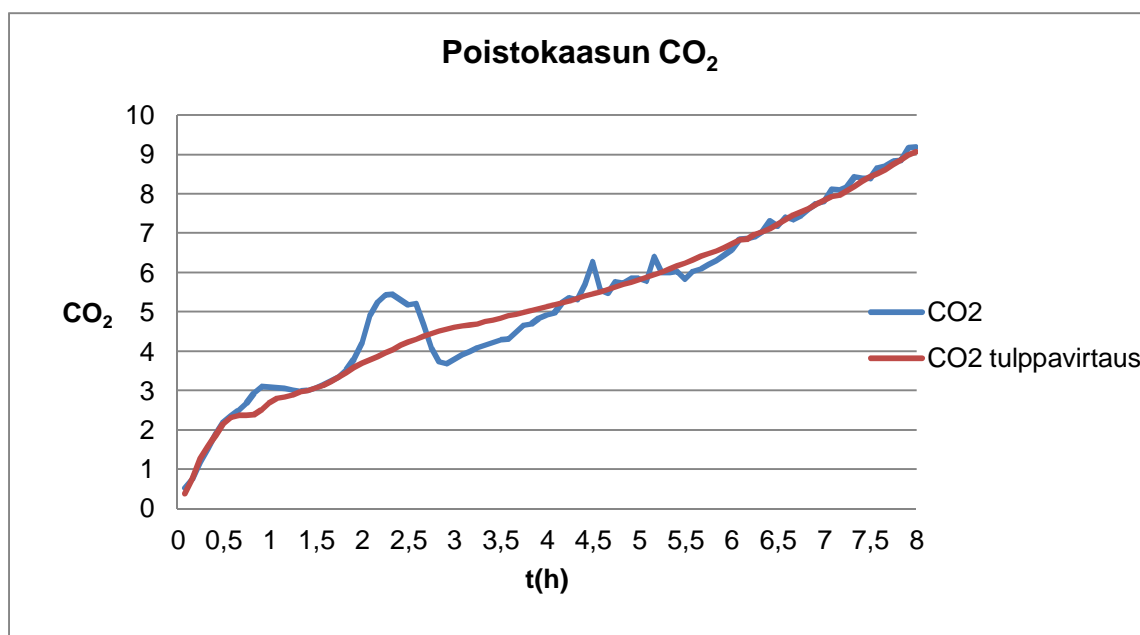
Taulukko 7. Asetetut ja laskennalliset kasvunopeuden ja solusaannin arvot kasvatuksessa, jossa spesifiseksi kasvunopeudeksi oli asetettu  $\mu = 0,25 \text{ h}^{-1}$ .

t(h)	Lähtöarvot:		Laskennalliset arvot	
	$\mu$	Y(x/s)	$\mu$	Y(x/s)
0	0,25	0,5		
0,5	0,25	0,5	0,149	0,250
1	0,25	0,5	0,371	0,783
1,5	0,25	0,5	0,031	0,054
2	0,25	0,5	0,233	0,433
2,5	0,25	0,5	0,274	0,528
3	0,25	0,5	0,188	0,322
3,5	0,25	0,5	0,243	0,425
4	0,25	0,5	0,248	0,431

Yllä olevasta taulukosta näkee, ettei kasvatus kyseisten arvojen valossa onnistunut kuten oli tarkoitus. Molempien arvojen heilahtelu kertoo, ettei kasvatus ole kovinkaan vertailukelpoinen. Tarkoituksenahan oli, että kasvunopeus ja solusaanto olisivat kasvatuksissa vakioita.

#### 6.4 Online-mittaukset

Kasvun etenemistä seurattiin etenkin poistokaasun hiilidioksidin avulla. Hiilidioksidin määrästä saatiin pienemmällä kasvunopeudella kasvua hyvin kuvaavat käyrät. Kuvassa 7 on verrattu ideaalisen- ja tulppavirtauskasvatuksen hiilidioksidin syntymisen kasvatuksen aikana.



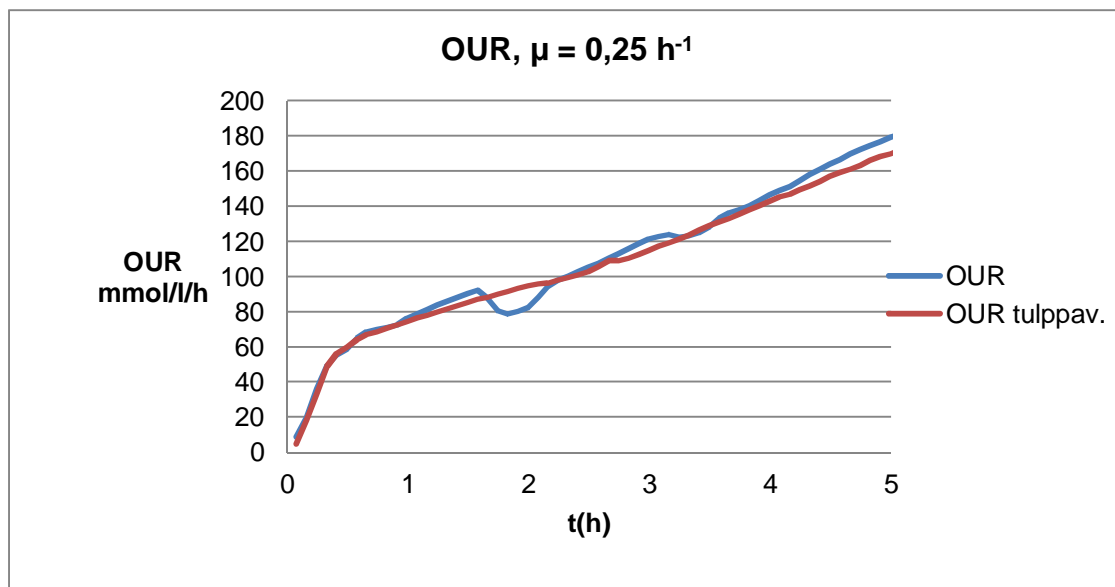
Kuva 7. Poistokaasun hiilidioksidipitoisuus ideaalisessa ja tulppavirtauskasvatuksessa, kun  $\mu = 0,15$

Kuvassa havaitaan kasvukäyrien vastaavan toisiaan keskimäärin varsin hyvin. Ideaalisesti sekoitetussa kasvatuksessa on jonkin verran kohinaa läpi kasvatuksen, kun taas tulppavirtauskasvatus on yleiskuvaltaan selkeästi tasaisempi. Mitään varmaa selitystä on kerätyn tiedon pohjalta mahdotonta antaa, mutta kenties tulppavirtauksessa laimenut ravintoliuos vähentää kohinaa.

Isommille piikeille ei keksitty varsinaista selitystä. Kasvatuksen alkuvaiheessa kasvukäyrää vääristää solujen kannalta yhtäkkinen elinympäristön muutos ja vallitseviin oloihin totuttelu. Kasvukäyrät näyttivät kuitenkin toistuvan samankaltaisina kasvatuksesta toiseen, joten ilmiön todettiin kuuluvan kasvatuksen luonteeseen.

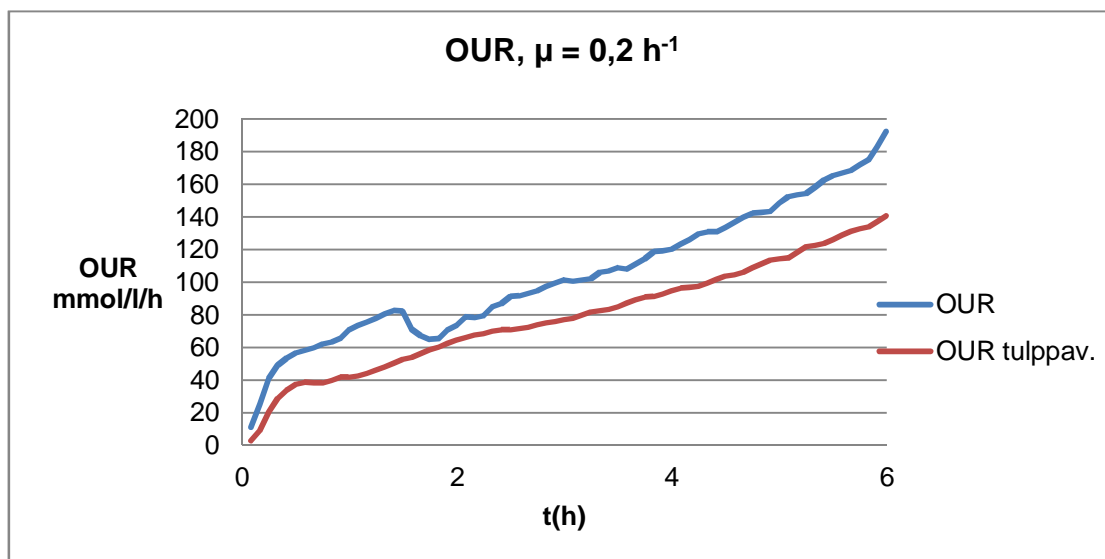
Hiilidioksidianturilla ei valitettavasti pystytty mittaamaan pitoisuuksia kuin n. 9 %:iin saakka, mistä syystä koko kasvatuksen kattavat käyrät voitiin piirtää vain kasvunopeuden ollessa  $0,15 \text{ h}^{-1}$ . Poistokaasun hapen mittaaminen kuitenkin toimi, joten kasvukäyrät piirrettiin laskennallisen hapen kulutusnopeuden OUR:n (oxygen uptake rate) avulla. OUR:n avulla piirretyt käyrät peilaavat poistokaasun hapen arvojen muodostamaa käyrää ja mallintavat siten kasvua hyvin. Myöskään OUR:n mukaan piirretyssä kuvassa 8 ei voida havaita merkittäviä eroja kasvatuksissa, joissa kasvunopeus oli  $0,25 \text{ h}^{-1}$ .





Kuva 8. OUR arvot ajan funktiona, kun  $\mu = 0,25 \text{ h}^{-1}$

Tulppavirtauskasvatuksen kasvukäyrä on jälleen hieman tasaisempi, mutta kasvatus-  
ten väliset erot ovat varsin mitättömiä myös hapenkulutusta tarkkailemalla. Sama ha-  
vainto tehtiin kasvunopeuden ollessa  $0,15 \text{ h}^{-1}$  (Kuva 7). Vain kasvunopeuden ollessa  
 $0,20 \text{ h}^{-1}$  voidaan havaita selkeä ero ideaalisesti sekoitetun ja tulppavirtauskasvatuksen  
kasvukäyrissä (Kuva 9)



Kuva 9. OUR arvot ajan funktiona, kun  $\mu = 0,2 \text{ h}^{-1}$

Kuvasta havaitaan selkeä ero kasvatusten välillä. Yhden kasvatuksen tulosten perus-  
teella ei kuitenkaan voi tehdä johtopäätöksiä tulppavirran vaikutuksesta, sillä muilla

kasvunopeuksilla kasvatusten väliset erot eivät olleet yhtä suuria ja mitään selkeää syytä sille, miksi kasvatukset eroaisivat toisistaan kasvunopeudella  $0,2 \text{ h}^{-1}$ , mutta eivät suuremmalla kasvunopeudella, ei pystytty löytämään.

Laskettu hengitysosamäärä (eng. respiratory quotient, RQ), eli tuotetun hiilidioksidin ja kulutetun hapen suhde, oli kaikissa kasvatuksissa n. 1 hiilidioksidimittauksen toimiessa. Hengitysosamäärän ollessa tasapainossa, toimii kasvatus täysin respiratiivisesti rajoittavan substraatin ollessa hiilihydraatti. Tämän perusteella kaikki kasvatukset olivat aerobisia, kuten oli tarkoitus. Kaikki online-mittaustulokset löytyvät liitteistä 9-24.

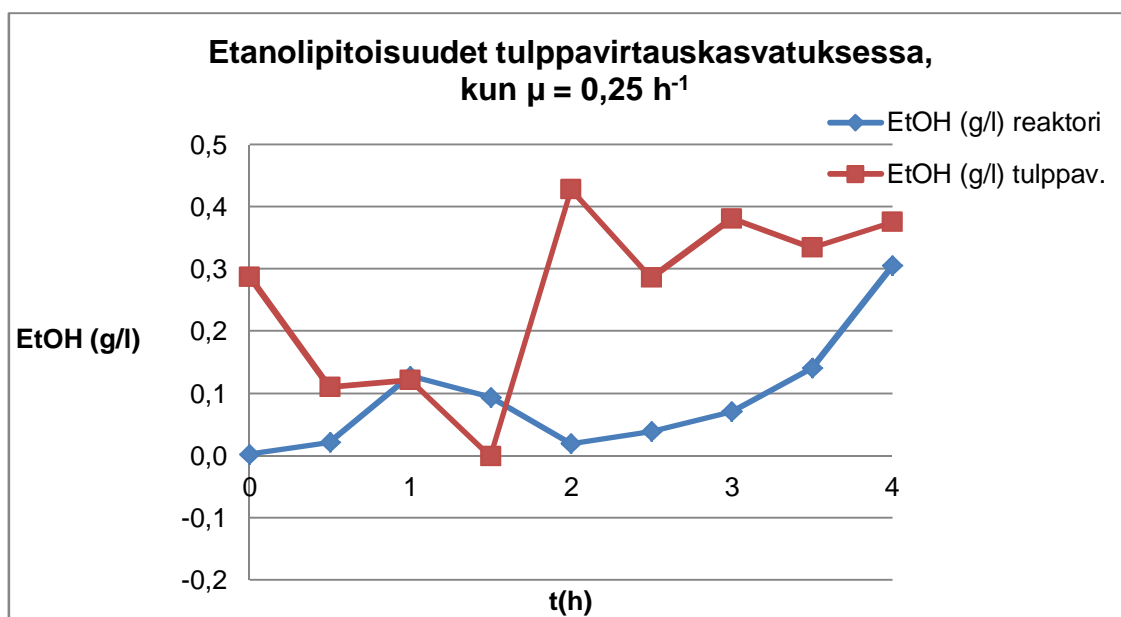
## 6.5 Entsymaattiset analyysit

Analyysien perusteella kasvuliuokseen ei glyserolia lukuun ottamatta kertynyt merkittäviä määriä sivutuotteita ideaalisesti sekoitetuissa tai tulppavirtauskasvatuksissa liuenneen hapen määrän ollessa yli 40 % alkuarvosta. Tulppavirrasta otetuista näytteistä mitattiin kohonneita pitoisuuksia tutkittuja aineita, mutta pitoisuudet vaihtelivat osittain epäjohdonmukaisesti.

### 6.5.1 Etanoli

Etanolin määrä ideaalisesti sekoitetuissa kasvatuksissa pysyi käytännössä mitättömänä. Etanolin määrä oli alle  $0,1 \text{ g/l}$  läpi kasvatuksen kaikilla kasvunopeuksilla.

Tulppavirtauskasvatuksissa etanolimäärytykset tehtiin sekä tulppavirtauskolonnin yläpäästä että reaktorin pohjasta otetuista näytteistä. Reaktorinäytteistä mitattu etanolin määrä vähennettiin tulppavirtauksesta otettujen näytteiden etanolipitoisuudesta. Kasvatusnopeuksilla  $0,15$  ja  $0,20 \text{ h}^{-1}$  reaktorin etanolipitoisuus oli alle  $0,1 \text{ g/l}$  koko kasvatuksen ajan, mutta kasvunopeuden ollessa  $0,25 \text{ h}^{-1}$  etanolin määrä vaihteli molemmissa otetuissa näytteissä. Kuvassa 10 on esitetty etanolipitoisuus sekä reaktorissa että tulppavirrassa kasvunopeuden ollessa  $0,25 \text{ h}^{-1}$ .



Kuva 10. Etanolipitoisuudet ajan funktiona kun  $\mu = 0,25 \text{ h}^{-1}$

Oletuksena oli, että etanolipitoisuus olisi tulppavirrassa suurempi kuin reaktorissa. Nyt tulppavirtauksesta hetkillä 1 h ja 1,5 h otetut näytteet i ovat ilmeisesti epäonnistuneet. Etanolia mitattiin pääsääntöisesti kuitenkin enemmän tulppavirrasta otetuista näytteistä, kuin reaktorista otetuista näytteistä. Etanolikitin kanssa ei missään vaiheessa ollut ollut ongelmia, ja näytteiden kanssa analysoitu kontrollinäyte onnistui hyvin. Hetkellä 3,5 h liuenneen hapen määrä oli enää 40 % alkuarvosta ja reaktoriin alkaa kertyä etanolia, mikä voitiin havaita muissakin kasvatuksissa (Liitteet 4-8).

### 6.5.2 Glukoosi

Glukoosimäärittystä käytettiin tässä työssä lähinnä epäsuorasti. Laskemalla tulppavirtauksen glukoositase saatiin selville virtauksen aikana laskennallisesti kulunut glukoosin määrä. Tulppavirrassa kulunut glukoosi laskettiin yhtälöllä (6)

$$(F_{in} \cdot C_{in} + F_{Sin} \cdot C_{Sin} - F_{out} \cdot C_{out}) \cdot \frac{62}{60} \text{ min} = m_S$$

missä  $F_{in}$  on tulppavirran kierrätysnopeus (451 ml/min),  $F_{Sin}$  on ravintoliuoksen syöttönopeus (ml/min),  $F_{out}$  on yhteenlaskettu tulppavirran kierrätysnopeus ja ravintoliuoksen syöttönopeus (ml/min),  $C_{in}$  on reaktorista mitattu glukoosipitoisuus (mg/ml),  $C_{Sin}$  on ravintoliuoksen glukoosipitoisuus (500 mg/ml) ja  $C_{out}$  on tulppavirran päästä mitattu glu-

koospitoisuus (mg/ml). Nämä on kerrottu tulppavirran viipymääjalla, jolloin tulokseksi saadaan tulppavirrassa kulunut glukoosi  $m_s$  (mg). Taulukossa 8 on esitetty laskelmallinen glukoosikulutus tulppavirrassa kasvatuksessa, jossa spesifiseksi kasvunopeudeksi oli määritetty  $0,2 \text{ h}^{-1}$ .

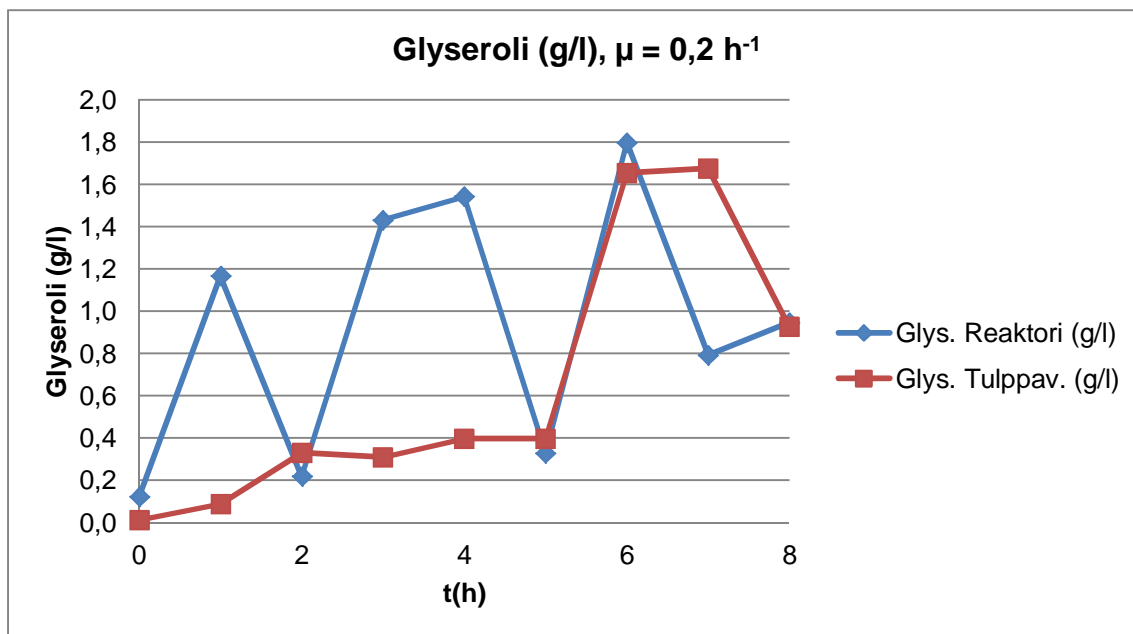
Taulukko 8. Glukoositase tulppavirtauskasvatuksessa, jossa  $\mu$  on asetettu  $0,2 \text{ h}^{-1}$ :iin

t (h)	$S_{in}$ (g/min)	$S_{out}$ (g/min)	$m_s$ (g)
0	0	0	0
1	0,67	0,41	0,27
2	0,82	0,42	0,42
3	0,97	0,50	0,49
4	1,19	0,49	0,73
5	1,44	0,66	0,81
6	1,80	0,69	1,14
7	2,16	1,46	0,72
8	2,64	1,85	0,81

Taulukossa  $S_{in}$  on taseen mukaan laskettu glukoosin syöttönopeus tulppavirtauskoloniin ja  $S_{out}$  vastaavasti glukoosin poistonopeus tulppavirrasta. Käyttämällä kirjallisuudesta löydettyä leiviniivan maksimi glukoosin käyttönopeutta (engl. glucose uptake rate, GUR)  $20 \text{ mmol/g}_{\text{soluja}}/\text{h}$  havaittiin, etteivät tulokset ole fysiologisesti mahdollisia [10]. Taulukossa käsiteltävän kasvatuksen solupitoisuus loppuhetkellä 8 h oli n.  $31,5 \text{ g/l}$ . Tällöin tulppavirrassa oli n.  $14,5 \text{ g}$  hiivasoluja. Tämä solumäärä kykenisi tulppavirran viipymäaikana kuluttamaan korkeintaan  $0,899 \text{ g}_{\text{glukoosia}}$ . Tulos ei mitenkään tue mitattua glukoosin kulutusta tulppavirrassa. Kasvunopeudella  $0,2 \text{ h}^{-1}$ , ja solusaannolla  $0,5 \text{ g/g}$  kyseisen solumäärän pitäisi kuluttaa vain noin  $0,097 \text{ g}$  glukoosia minuutissa.

### 6.5.3 Glyseroli

Kuvassa 11 on esitetty glyserolimääritysten tulokset tulppavirtauskasvatuksessa, jossa spesifiseksi kasvunopeudeksi oli määritetty  $0,20 \text{ h}^{-1}$ .

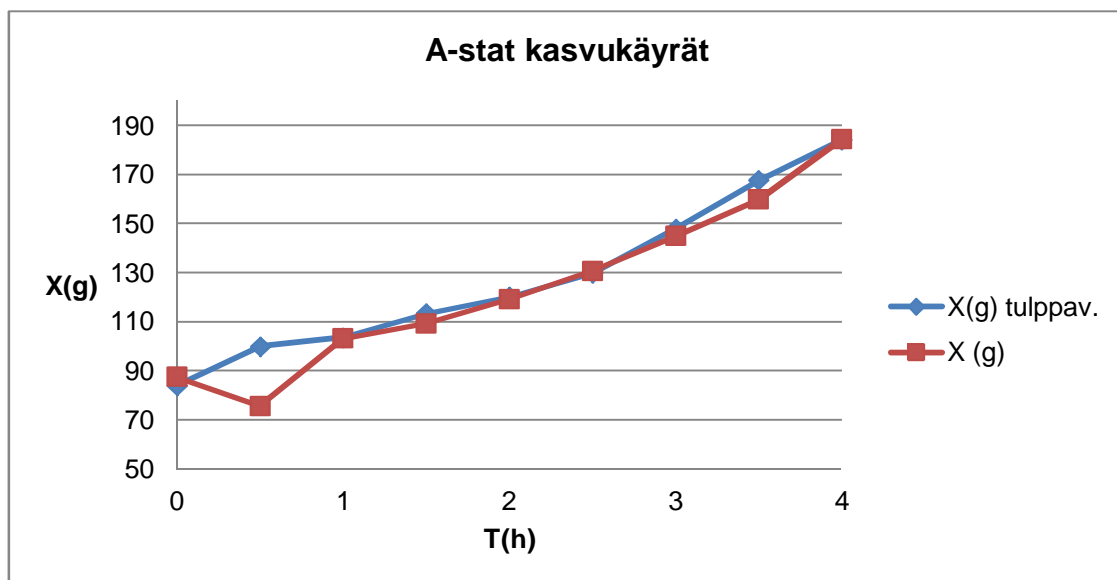


Kuva 11. Glyserolimäärät reaktorissa ja tulppavirtauksessa, kun  $\mu = 0,2 \text{ h}^{-1}$ .

Kuvasta 11 voidaan havaita glyserolinäytteiden epäonnistuminen. Pitoisuudet ovat erittäin suuria esimerkiksi etanolipitoisuuksiin verrattuna, minkä ei kyseisissä koeolosuhteissa pitäisi olla mahdollista. Kaikki glyserolipitoisuustulokset päätettiin hylätä.

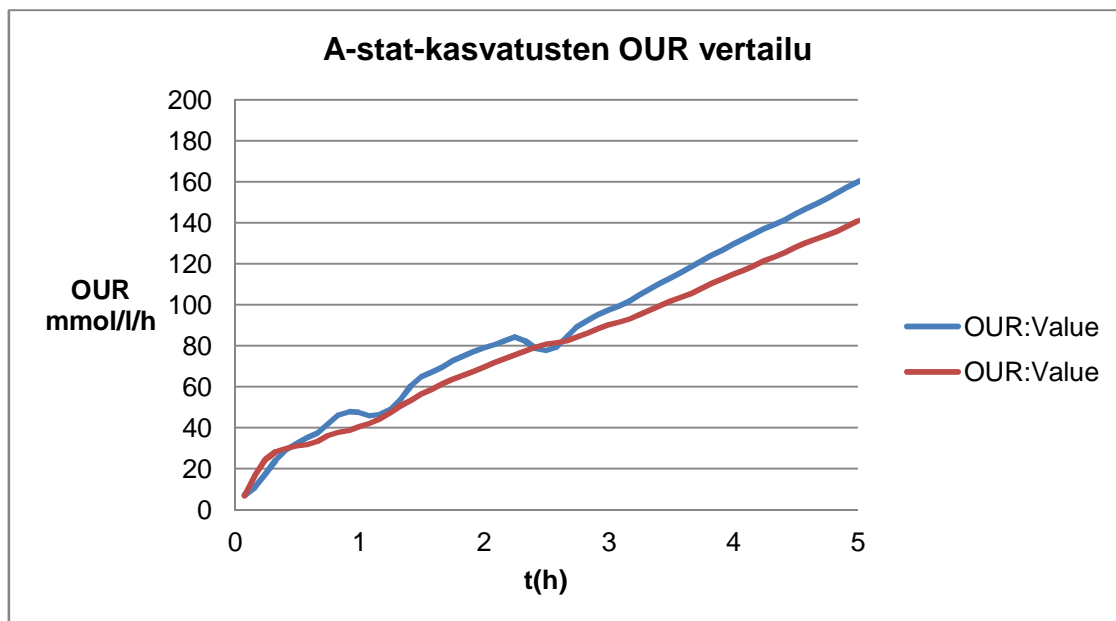
## 6.6 A-stat

A-stat-kasvatusten erot eivät olleet solumassan kasvun perusteella merkittäviä (Kuva 12)



Kuva 12. A-stat-kasvatusten kasvukäyrän solumassan mukaan ajan funktiona.

A-stat-kasvatuksista otetuista näytteistä määritettiin solutiheys eri tekniikalla kuin muista kasvatuksista. Kyseistä määrittystapaa ei ollut kokeiltu etukäteen, mistä johtuen tekniikan epävarmuus selvisi liian myöhään. Rinnakkaisnäytteiden erot vaihtelivat n. 0:sta 5 %:iin. Suoritetuista kuivapainoanalyyseistä kuitenkin vain yksi (hetkellä 0,5 h ideaalisesti sekoitetusta kasvatuksesta otettu näyte) epäonnistui täysin. OUR:n mukaan piirityssä kuvassa 13 sen sijaan näkyy eroa kasvatusten välillä.



Kuva 13. A-stat-kasvatukset kuvattuna OUR:n mukaan ajan funktiona.

Kuvassa näkyy jälleen kaikissa vertailuissa havaittu tasaisempi kasvukäyrä tulppavirtauskasvatuksessa. Voidaan myös todeta, että vaikka solumassa kasvoi kasvatuksissa samaa tahtia, käyttää ideaalisesti sekoitettu kasvatusta enemmän happea.

Kasvunopeus kiihtyi läpi kasvatusten, kuten oli tarkoituskin.

## 7 Virhelähteet

### 7.1 Koejärjestely

Rajallisen ajan ja kokemattomuuden takia ei suoritettu koetoistoja, joten tuloksista ei pysty tekemään luotettavia johtopäätöksiä. Tämän lisäksi tulppavirtauksen toteutuksessa havaittiin olevan puutteita. Tulppavirtauksessa ei ollut erillistä, esimerkiksi passiivista sekoitinta, vaan ainoa sekoituksen lähde oli jatkuva pumppaus. Koska ravintoliuos oli hyvin väkevää, ei voida olla varmoja siitä, että se sekoittui täydellisesti kasvatusalustaan tulppavirtauksen aikana.

### 7.2 Online-mittaukset

Kasvatuksen etenemistä mitattiin jatkuvasti poistokaasun hiilidioksidin perusteella. Anturi ei kuitenkaan mitannut poistokaasun hiilidioksidipitoisuutta kuin n. 9 %:iin, joten

suuremmilla kasvunopeuksilla kasvukäyrää saatiin tutkittua vain optisen tiheyden määrittämisestä, sekä kuivapainoanalyysistä. Online-mittauksiin käytetty ohjelma laski kerätyistä datasta muun muassa OUR- (oxygen uptake rate, hapen käyttönopeus) sekä RQ- (respiratory quotient) arvot, mutta näiden käyttö kasvun kuvaamiseen on rajallista.

Reaktoriin oli liitetty myös kasvuliuksen optista tiheyttä mittaava anturi, mutta sen tuottama data oli käytännössä käyttökeltontont. Kasvuliuos oli kyseiselle anturille ilmeisesti liian sameaa, ja mitattu arvo saavutti anturin maksimin hyvin nopeasti kasvatuksen aloittamisen jälkeen.

### 7.3 Offline-mittaukset

Offline-mittauksien suurimmat ongelmat tuottivat entsymaattiset analyysikitit, joilla tutkittiin glukoosin, etanolin ja glyserolin määriä, mutta myös solutiheyden määrittämisessä oli lieviä ongelmia. Solutiheyden optista määrittäystä varten olisi pitänyt valmistaa kalibrointisuora, vain yhteen suhdelukuun luottamisen sijaan. Kasvukäyrät piirrettiin nyt laskennallisen solutiheyden mukaan, mikä vääristää kuvaajia hieman, muttei yleiskuvan kannalta merkittävästi. Kaikissa laskelmissa käytettiin kuitenkin kuivapainoanalyysistä saatuja tuloksia mahdollisuuksien mukaan.

#### 7.3.1 Näytteenotto

Näytteenoton perusongelma oli pieni kasvatustilavuus, minkä takia näytetilavuuden piti olla mahdollisimman pieni. Näytteenotto suoritettiin reaktorin alaosaan sijaitsevasta hanasta. Hanaan näytteidenoton välissä jäävän alustan solumassa muodosti hanaan ns. tulpan, josta pyrittiin pääsemään eroon laskemalla hanaa kasvuliusta, kunnes se vaikutti silmämääräisesti tasalaatuiselta. Ilmeisesti tästä johtuen osa näytteistä ei vastannut reaktorin sisältöä riittävän hyvin, ja optinen tiheyden määrittäminen tuotti tuloksia, jotka eivät jälkeempään tarkasteltaessa vaikuttaneet yleiskuvaan sopivilta.

Toisen ongelman muodosti kasvatusten loppuvaiheessa korkea solupitoisuus. Näytteistä steriilisuodatettiin kaksi 1,5 ml:n näytettä entsymaattisia analyysikittejä varten, mutta steriilisuodatin tukkeutui hyvin nopeasti ja näytteen pusertaminen suodattimen läpi kävi hitaaksi ja vaikeaksi. On tietenkin mahdotonta arvioida näytteenottoajan hidastumisen vaikutusta, mutta olettaisin sen olevan minimaalista.



### 7.3.2 Glyserolianalyysi

Oletusarvoisesti kaikkia sekundäärimetaboliitteja pitäisi löytyä enemmän tulppavirtauksesta kuin reaktorista, toisin kuin esimerkiksi kuvan 11 kasvatuksessa. Leiviniiva tuottaa glyserolia lähinnä vähentääkseen osmoottista painetta tai hapettaakseen NADH:a liuenneen hapen määrän ollessa hyvin alhainen. Tehdyissä kasvatuksissa liuenneen hapen määrä ei varsinkaan kasvatuksen alkuvaiheessa selitä mitattuja glyserolimääriä. Myös glyseroli konsentraatiot vaikuttavat epäluotettavilta otettaessa huomioon, ettei etanolikonsentraatio ylittänyt 0,5 g/l missään kasvatuksessa. Glyserolimääritykset havaittiin tarkasteltaessa käytännössä kelvottomiksi arvojen heitellessä valtavasti ilman varsinaista selitystä. [1, 12, 13.]

Käytetty testikitti on melko työläs ja monivaiheinen, mikä tietenkin lisää näytteenkäsittelyvaiheessa tapahtuvien virheiden riskiä, mutta testikitin mukana toimitetun kontrollinäytteen analysointi onnistui aina ongelmitta.

### 7.3.3 Glukoosi ja etanoli

Glukoosi- ja etanolimääritykset tuottivat tuloksia jotka vaikuttivat aluksi uskottavilta, mutta osoittautuivat varsin epäilyttäviksi tarkemmassa analysoinnissa. Tuloksia pyrittiin saamaan laskemalla tulppavirtauksessa kulunutta glukoosia ja syntynyttä etanolia, mutta tässäkin päädyttiin umpikujaan. Kokeiden solutiheydellä ja tulppavirtauksen viipymääjalla ei leiviniivalle ole fysiologisesti mahdollista kuluttaa mittaustuloksia vastaavaa määrää glukoosia. Kerätystä datasta on käytännössä mahdotonta päätellä virhelähdettä varmasti.

## 7.4 A-stat

Kasvunopeuden lähtöpiste on ilmeisesti liian korkea a-stat-kasvatukselle kyseisissä olosuhteissa, sillä yleensä aloitetaan esimerkiksi kasvunopeudella  $0,05 \text{ h}^{-1}$  eikä  $0,15 \text{ h}^{-1}$ . Myös kasvunopeuden kiihtyminen pidetään yleensä pienempänä kuin  $0,02 \text{ h}^{-2}$ , esimerkiksi  $0,01 \text{ h}^{-2}$ .

## 8 Korjausehdotuksia

### 8.1 Koejärjestely

Jälkikäteen tarkasteltuna tulppavirtaukseen toteutuksessa oli jonkin verran puutteita. Nyt toteutetussa järjestelyssä ei voi varmasti sanoa, oliko virtaan syötetty ravintoliuos sekoittunut tasaisesti kasvatusalustaan virtauksen viipymäaikana. Koejärjestelyn olisi pitänyt myös sisältää koetoistoja koejärjestelyn toimivuuden varmistamiseksi.

### 8.2 Testit

Tehdyistä kokeista kerätty näytemäärä osoittautui yhdelle henkilölle liian suureksi offline-testeillä analysoitavaksi. Työläiden testikittien käyttö vaatii paljon aikaa ja on liian virhealtis käytettäväksi tämänkaltaisten näytteiden käsittelyyn. Etanoli- ja glukoosipitoisuuksien mittaamiseen on olemassa online-antureita, joiden avulla olisi saatu huomattavasti käyttökelpoisempaa dataa kasvatuksen kulusta. Tarkemmilla tuloksilla ja lyhyemmällä näytteenottovälillä kokonaiskuva reaktorin tapahtumista olisi ollut paljon kattavampi, kuin nyt kerätystä tiedosta voidaan muodostaa.

Toinen vaihtoehto näytteiden käsittelyyn olisi nestekromatografia. Nestekromatografilla olisi saatu mitattua glukoosi-, etanoli- ja glyserolipitoisuudet yhdellä ajolla per näyte. Nyt tarve näytteiden uudelleen käsittelyyn selvisi liian myöhään, eikä 96 näytteen uudelleenanalysointi ollut mahdollista.

## 9 Yhteenveto

Tulppavirtaus vaikutti kasvukäyrään merkittävästi vain kasvunopeuden ollessa säädetty  $0,20 \text{ h}^{-1}$ :n. Muissa kasvatuksissa ei voitu solumassan kasvun tai hapenkulutuksen perusteella havaita kovin suuria eroja. Tulppavirtauskasvatusten kasvukäyrät olivat tuntemattomasta syystä kaikilla kasvunopeuksilla tasaisempia.

Hieman paradoksaalisesti samankaltaisista kasvukäyristä huolimatta sekä solusaanto että kasvunopeus olivat kaikissa tulppavirtauskasvatuksissa pienempiä kuin ideaalisesti sekoitetuissa. Solusaannot olivat kasvunopeuksilla  $0,15 \text{ h}^{-1}$ ,  $0,20 \text{ h}^{-1}$  ja  $0,25 \text{ h}^{-1}$  pienentyneet 14 %, 17 % ja 11 % vastaaviin ideaalisesti sekoitettuihin kasvatuksiin verrattuna.

Tulppavirtauksesta mitattuihin glukoosipitoisuuksiin ja substraatin syöttönopeuteen pohjaava glukoositaselaskelma osoitti kuluvan glukoosin määrien olevan hiivalle fysiologisesti mahdottomia, mikä viittaa koejärjestelyn ratkaisevaan puutteellisuuteen.

Tulppavirtauskolonnista otetuista näytteistä mitattiin selkeitä etanolipitoisuuksia, mikä osoittaa mikrobin käyttäneen rajoittavaa substraattia muuhunkin kuin kasvun kannalta välttämättömiin prosesseihin.

Tulppavirrasta mitattu etanoli ja pienentynyt solusaanto tukevat aiemman tutkimuksen [11] tuloksia, mutta koetoistojen puuttuessa tulosten tarkkuus ja merkitsevyys jää spekuloinnin varaan.

A-stat-kasvatukset eivät eronneet toisistaan mittaustulosten perusteella. Valitut parametrit eivät sopineet kyseiseen koejärjestelyyn kovin hyvin, ja syöttösekvenssi oli laskettu väärin.

## Lähteet

- 1 David R. Berry; I. Russell; Graham G. Stewart. 1987. Yeast Biotechnology. Springer.
- 2 J.J. Zhong; K. Fujiyama; T. Seki; T. Yoshida. 1994. A quantitative analysis of shear effects on cell suspension and cell culture of *perilla frutescens* in bioreactors.
- 3 Aittomäki, Esa; Eerikäinen, Tero; Leisola, Matti; Ojamo, Heikki; Suominen, Ilari; von Weymarn, Niklas. 2002. Bioprosessiteknikka. WSOY.
- 4 Jeongseok Lee, Sang Yup Lee, Sunwon Park, Anton P.J. Middelberg. Control of fed-batch fermentations. 1999. Biotechnology Advances.
- 5 P. Van Hoek, J. P. Van Dijken, and J. T. Pronk. Effect of Specific Growth Rate on Fermentative Capacity of Baker's Yeast. 1998. Applied and Environmental Microbiology.
- 6 Graeme M. Walker. 1998. Yeast physiology and biotechnology. John Wiley & Sons.
- 7 T. Paalme,\* R. Elken, R. Vilu, M. Korhola. Growth efficiency of *Saccharomyces cerevisiae* on glucose/ethanol media with a smooth change in the dilution rate (A-stat). 1997. Enzyme and Microbial Technology 20.
- 8 K. Kasemets, M. Drews, I. Nisamedtinov, K. Adamberg, T. Paalme. Modification of A-stat for the characterization of microorganisms. 2003. Journal of Microbiological Methods 55.
- 9 P. van Hoek, E. de Hulster, J. P. van Dijken, J. T. Pronk. 1999. Fermentative capacity in high-cell-density fed-batch cultures of baker's yeast. Biotechnology and Bioengineering (2000).
- 10 J.L. Hjersted M.A. Henson. Steady-state and dynamic flux balance analysis of ethanol production by *Sacchromyces cerevisiae*. 2008. IET Systems Biology.
- 11 F. Bylund; E. Collet; S.-O. Enfors; G. Larsson. 1998. Substrate gradient formation in the large-scale bioreactor lowers cell yield and increases by-product formation. Bioprocess engineering 18.
- 12 H. Cordiera, F. Mendes, I. Vasconcelos, J. M. Fancoisa. 2007. A metabolic and genomic study of engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains for high glycerol production. Metabolic engineering. Elsevier.
- 13 P. M. Bruinenberg, R. Jonker, J. P. van Dijken, W. A. Scheffers. Utilization of formate as an additional energy source by glucose-limited chemostat cultures of *Candida utilis* CBS 621 and *Saccharomyces cerevisiae* CBS 8066. 1985. Archives of Microbiology.

# Ethanol

## UV-method

for the determination of ethanol in foodstuffs and other materials

**Simplified procedure for the determination of ethanol in alcoholic beverages: see pt. 13**

**Cat. No. 10 176 290 035**

Test-Combination for 33 determinations

## BOEHRINGER MANNHEIM / R-BIOPHARM Enzymatic BioAnalysis / Food Analysis

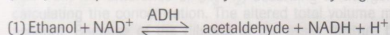
For *in vitro* use only

Store at 2-8°C

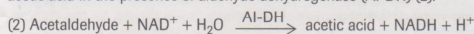
For recommendations for methods and standardized procedures see references (2)

### Principle (Ref. 1)

Ethanol is oxidized to acetaldehyde by nicotinamide-adenine dinucleotide (NAD) in the presence of the enzyme alcohol dehydrogenase (ADH) (1).



The equilibrium of this reaction lies on the side of ethanol and NAD. It can be completely displaced to the right side at alkaline conditions and by trapping of the acetaldehyde formed. Acetaldehyde is quantitatively oxidized to acetic acid in the presence of aldehyde dehydrogenase (Al-DH) (2).



NADH is determined by means of its light absorbance at 334, 340 or 365 nm.

### The Test-Combination contains

1. Bottle 1 with approx. 100 ml of solution, consisting of: potassium diphosphate buffer, pH approx. 9.0
2. Bottle 2 with approx. 30 tablets, each tablet contains: NAD, approx. 4 mg; aldehyde dehydrogenase, approx. 0.8 U
3. Bottle 3 with approx. 1.6 ml suspension, consisting of: ADH, approx. 7000 U
4. Bottle 4 with ethanol assay control solution for assay control purposes (measurement of the assay control solution is not necessary for calculating the results.) Use the assay control solution undiluted. (Expiry date: see pack label)

### Preparation of solutions

1. Use contents of bottle 1 undiluted.
2. Dissolve **one** tablet of bottle 2 with **3 ml** solution of bottle 1 in a beaker or in a centrifuge tube for each assay (blank or samples) depending on the number of determinations. Use forceps for taking the tablets out of bottle 2. This results in reaction mixture 2\*.
3. Use contents of bottle 3 undiluted.

### Stability of reagents

Solution 1 is stable at 2-8°C (see pack label).

Bring solution 1 to 20°C before use.

The contents of bottle 2 are stable at 2-8°C (see pack label).

Reaction mixture 2 is stable for one day at 2-8°C.

Bring reaction mixture 2 to 20°C before use.

The contents of bottle 3 are stable at 2-8°C (see pack label).

### Procedure

Wavelength<sup>1</sup>: 340 nm, Hg 365 nm or Hg 334 nm  
 Glass cuvette<sup>2</sup>: 1.00 cm light path  
 Temperature: 20°C  
 Final volume: 3.150 ml  
 Read against air (without a cuvette in the light path), against water or against blank<sup>3</sup>  
 Sample solution: 0.3-12 µg ethanol/assay<sup>4</sup> (in 0.100-0.500 ml sample volume)

Pipette into cuvettes	Blank	Sample
reaction mixture 2*	3.000 ml	3.000 ml
redist. water	0.100 ml	-
sample solution**	-	0.100 ml
Mix***, after approx. 3 min read absorbances of the solutions (A <sub>1</sub> ). Start reaction by addition of:		
suspension 3	0.050 ml	0.050 ml
Mix***, after completion of the reaction (approx. 5-10 min) read absorbances of the solutions immediately one after another (A <sub>2</sub> ).		

It is absolutely necessary to stopper the cuvettes, e.g., with Parafilm, during measurement (see "Instructions for performance of assay") in order to prevent the assay mixture from adsorption of ethanol from air.

\* For simplification of the assay performance it is also possible to pipette directly 3.000 ml of solution 1 into the cuvette. Afterwards add 1 tablet from bottle 2 and dissolve it (for solubilization crush the tablet with a glass rod or a plastic spatula). Continue as described in the scheme. The volume error of approx. 1% (the increase of volume caused by one tablet/3.150 ml final volume) has to be taken into account in the calculation by multiplication of the result with 1.01.

\*\* Rinse the enzyme pipette or the pipette tip of the piston pipette with sample solution before dispensing the sample solution; pipette sample solution always under the surface of the reaction mixture 2.

\*\*\* For example, with a plastic spatula or by gentle swirling after closing the cuvette with Parafilm (trademark of the American Can Company, Greenwich, Ct., USA)

Determine the absorbance differences (A<sub>2</sub>-A<sub>1</sub>) for both, blank and sample. Subtract the absorbance difference of the blank from the absorbance difference of the sample.

$$\Delta A = (A_2 - A_1)_{\text{sample}} - (A_2 - A_1)_{\text{blank}}$$

The measured absorbance differences should, as a rule, be at least 0.100 absorbance units to achieve sufficiently precise results (see "Instructions for performance of assay" and "Sensitivity and detection limit", pt.4).

### Calculation

According to the general equation for calculating the concentration in reactions in which the amount of NADH formed is stoichiometric to half the amount of substrate:

$$c = \frac{V \times \text{MW}}{\epsilon \times d \times v \times 2 \times 1000} \times \Delta A \text{ [g/l]}$$

V = final volume [ml]

v = sample volume [ml]

MW = molecular weight of the substance to be assayed [g/mol]

d = light path [cm]

ε = extinction coefficient of NADH at:

340 nm = 6.3 [l × mmol<sup>-1</sup> × cm<sup>-1</sup>]

Hg 365 nm = 3.4 [l × mmol<sup>-1</sup> × cm<sup>-1</sup>]

Hg 334 nm = 6.18 [l × mmol<sup>-1</sup> × cm<sup>-1</sup>]

It follows for ethanol:

$$c = \frac{3.150 \times 46.07}{\epsilon \times 1.00 \times 0.100 \times 2 \times 1000} \times \Delta A = \frac{0.7256}{\epsilon} \times \Delta A \text{ [g ethanol/l sample solution]}$$

If the sample has been diluted during preparation, the result must be multiplied by the dilution factor F.

When analyzing solid and semi-solid samples which are weighed out for sample preparation, the result is to be calculated from the amount weighed:

$$\text{Content}_{\text{ethanol}} = \frac{c_{\text{ethanol}} \text{ [g/l sample solution]}}{\text{weight}_{\text{sample}} \text{ in g/l sample solution}} \times 100 \text{ [g/100 g]}$$

1 The absorption maximum of NADH is at 340 nm. On spectrophotometers, measurements are taken at the absorption maximum; if spectralline photometers equipped with a mercury vapor lamp are used, measurements are taken at a wavelength of 365 nm or 334 nm.

2 If desired, disposable cuvettes may be used instead of glass cuvettes.

3 For example, when using a double-beam photometer.

4 See instructions for performance of assay

5 Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG; Untersuchung von Lebensmitteln: Ermittlung des Ethanolgehaltes in Alkohol und alkoholhaltigen Erzeugnissen aller Art (ausser Wein und Bier), L 3700-1 (Nov. 1982). See also Reference 3.9, page 783. For corrections for the effect of temperature see e.g. Official Journal of the European Communities L 272 (3 October 1990), Legislation, Commission Regulation (EEC) No 2676/90 of 17 September 1990 determining Community methods for the analysis of wines.



# Glycerol

## UV-method

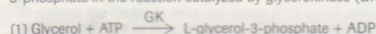
for the determination of glycerol in foodstuffs and other materials.

**Cat. No. 10 148 270 035**

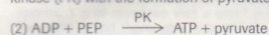
Test-Combination for 3 × 11 determinations

### Principle (Ref. 1)

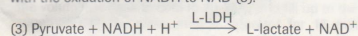
Glycerol is phosphorylated by adenosine-5'-triphosphate (ATP) to L-glycerol-3-phosphate in the reaction catalyzed by glycerokinase (GK) (1).



The adenosine-5'-diphosphate (ADP) formed in the above reaction is reconverted into ATP by phosphoenolpyruvate (PEP) with the aid of pyruvate kinase (PK) with the formation of pyruvate (2).



In the presence of the enzyme L-lactate dehydrogenase (L-LDH), pyruvate is reduced to L-lactate by reduced nicotinamide-adenine dinucleotide (NADH) with the oxidation of NADH to NAD (3).



The amount of NADH oxidized in the above reaction is stoichiometric to the amount of glycerol. NADH is determined by means of its light absorption at 334, 340 or 365 nm.

### The Test-Combination contains

- Three bottles 1, with approx. 2 g coenzyme/buffer mixture each, consisting of:  
glycylglycine buffer, pH approx. 7.4; NADH, approx. 7 mg; ATP, approx. 22 mg; PEP-CHA, approx. 11 mg; magnesium sulfate
- Bottle 2 with approx. 0.4 ml suspension, consisting of:  
pyruvate kinase, approx. 240 U; L-lactate dehydrogenase, approx. 220 U
- Bottle 3 with approx. 0.4 ml glycerokinase suspension, approx. 34 U
- Bottle 4 with glycerol assay control solution for assay control purposes (measurement of the assay control solution is not necessary for calculating the results.) Use the assay control solution undiluted. (Expiry date: see pack label)

### Preparation of solutions for 10 determinations

- Dissolve contents of one bottle 1 with 11 ml redist. water. Before use allow the solution to stand for approx. 10 min at 20-25°C.
- Use contents of bottle 2 undiluted.
- Use contents of bottle 3 undiluted.

### Stability of reagents

The contents of the bottles 1 are stable at 2-8°C (see pack label).

Solution 1 is stable for 4 days at 2-8°C.

Bring solution 1 to 20-25°C before use.

The contents of bottles 2 and 3 are stable at 2-8°C (see pack label).

### Procedure

Wavelength<sup>1</sup>: 340 nm, Hg 365 nm or Hg 334 nm

Glass cuvette<sup>2</sup>: 1.00 cm light path

Temperature: 20-25°C

Final volume: 3.020 ml

Read against air (without a cuvette in the light path) or against water

Sample solution: 1-40 µg glycerol/assay<sup>3</sup> (in 0.100-2.000 ml sample volume).

1 The absorption maximum of NADH is at 340 nm. On spectrophotometers, measurements are taken at the absorption maximum; if spectralline photometers equipped with a mercury vapor lamp are used, measurements are taken at a wavelength of 365 nm or 334 nm.

2 If desired, disposable cuvettes may be used instead of glass cuvettes.

3 See instructions for performance of assay

4 It is necessary to wait for completion of this pre-reaction (ADP in ATP and pyruvate in PEP react), otherwise the results will be too high.

## BOEHRINGER MANNHEIM / R-BIOPHARM Enzymatic BioAnalysis / Food Analysis

For *in vitro* use only

Store at 2-8°C

For recommendations for methods and standardized procedures see references (2)

Pipette into cuvettes	Blank	Sample
solution 1	1.000 ml	1.000 ml 0.335
sample solution*	-	0.100 ml 0.035
redist. water	2.000 ml 3.67	1.900 ml 0.65
suspension 2	0.010 ml	0.010 ml 0.0033
Mix**, wait for completion of the pre-reaction <sup>4</sup> (approx. 5-7 min) and read absorbances of the solutions (A <sub>1</sub> ). Start reaction by addition of:		
suspension 3	0.010 ml	0.010 ml 0.0033
Mix**, wait for completion of the reaction (approx. 5-10 min) and read the absorbances of blank and sample immediately one after another (A <sub>2</sub> ). If the reaction has not stopped after 15 min, continue to read the absorbances at 2 min intervals until the absorbance decreases constantly over 2 min.		

\* Rinse the enzyme pipette or the pipette tip of the piston pipette with sample solution before dispensing the sample solution.

\*\* For example, with a plastic spatula or by gentle swirling after closing the cuvette with Parafilm (trademark of the American Can Company, Greenwich, CT, USA)

If the absorbance A<sub>2</sub> decreases constantly, extrapolate the absorbances to the time of the addition of suspension 3 (GK).

Determine the absorbance differences (A<sub>1</sub>-A<sub>2</sub>) for both, blank and sample. Subtract the absorbance difference of the blank from the absorbance difference of the sample.

$$\Delta A = (A_1 - A_2)_{\text{sample}} - (A_1 - A_2)_{\text{blank}}$$

The measured absorbance differences should, as a rule, be at least 0.100 absorbance units to achieve sufficiently precise results (see "Instructions for performance of assay" and "Sensitivity and detection limit", pt. 4).

If the absorbance difference of the sample (ΔA<sub>sample</sub>) is higher than 1.000 (measured at 340 nm, Hg 334 nm resp.) or 0.500 (measured at Hg 365 nm) respectively, the concentration of glycerol in the sample solution is too high. The sample is to be diluted according to the dilution table in that case.

### Calculation

According to the general equation for calculating the concentration:

$$c = \frac{V \times MW}{\epsilon \times d \times v \times 1000} \times \Delta A \text{ [g/l]}$$

V = final volume [ml]

v = sample volume [ml]

MW = molecular weight of the substance to be assayed [g/mol]

d = light path [cm]

ε = extinction coefficient of NADH at:

340 nm = 6.3 [l × mmol<sup>-1</sup> × cm<sup>-1</sup>]

Hg 365 nm = 3.4 [l × mmol<sup>-1</sup> × cm<sup>-1</sup>]

Hg 334 nm = 6.18 [l × mmol<sup>-1</sup> × cm<sup>-1</sup>]

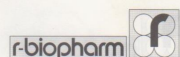
It follows for glycerol

$$c = \frac{3.020 \times 92.1}{\epsilon \times 1.00 \times 0.100 \times 1000} \times \Delta A = \frac{2.781}{\epsilon} \times \Delta A \text{ [g glycerol/l sample solution]}$$

If the sample has been diluted during preparation, the result must be multiplied by the dilution factor F.

When analyzing solid and semi-solid samples which are weighed out for sample preparation, the result is to be calculated from the amount weighed:

$$\text{Content}_{\text{glycerol}} = \frac{c_{\text{glycerol}} \text{ [g/l sample solution]}}{\text{weight}_{\text{sample}} \text{ in g/l sample solution}} \times 100 \text{ [g/100 g]}$$



0705.10249041®





Ideaallinen sekoitus, $\mu = 0,15 \text{ h}^{-1}$			Tulppavirtauskasvatus, $\mu = 0,15 \text{ h}^{-1}$		
t (h)	S(g)	X (g)	t (h)	S(g)	X (g)
0	0	97,7	0	0	87,9
1	27,5	109,6	1	26	106,0
2	61	115,4	2	55	117,8
3	96	130,4	3	92,5	123,4
4	140	141,7	4	130,5	139,5
5	189,5	169,5	5	182	157,1
6	248,5	194,3	6	233,5	166,7
7	315,5	224,3	7	297,5	185,3
8	384,5	243,0	8	365	233,2

Ideaallinen sekoitus, $\mu = 0,20 \text{ h}^{-1}$			Tulppavirtauskasvatus, $\mu = 0,20 \text{ h}^{-1}$		
t (h)	S (g)	X (g)	t (h)	S(g)	X (g)
0	0	86,7	0	0	79,3
1	38	104,6	1	35	97,5
2	85	126,4	2	77	112,7
3	143	153,8	3	130	129,1
4	216,5	186,3	4	192,5	150,4
5	296,5	221,8	5	274	187,5
6	400	255,0	6	365	209,3
7	527	301,3	7	480,5	251,5

Ideaallinen sekoitus, $\mu = 0,25 \text{ h}^{-1}$			Tulppavirtauskasvatus, $\mu = 0,25 \text{ h}^{-1}$		
t (h)	S (g)	X (g)	t (h)	S (g)	X (g)
0,0	0	83,7	0	0	89,1
0,5	26	90,2	0,5	27	99,8
1,0	49,5	108,6	1	53,5	105,4
1,5	81,5	110,4	1,5	85	120,5
2,0	113	124,0	2	118,5	124,5
2,5	147,5	142,2	2,5	158,5	146,0
3,0	191	156,2	3	202,5	171,3
3,5	238,5	176,4	3,5	259	177,5
4,0	292,5	199,7	4	312,5	198,2
4,5	352,5	208,4	4,5	375,5	213,4
5,0	433	246,3	5	446	241,6



$\mu=0,15$			
t (h)	Etanoli (g/l)	Glyseroli (g/l)	Glukoosi (g/l)
0	0,038	0,004	0,017
1	0,023	0,008	
2	0,058	0,017	0,037
3	0,044	0,046	
4	0,021	0,013	0,027
5	0,023	0,017	
6	0,020	0,013	0,024
7	0,049	0,030	
8	0,024	0,030	0,024
$\mu=0,20$			
t (h)	Etanoli (g/l)	Glyseroli (g/l)	Glukoosi (g/l)
0	0,000	0,014	-0,008
1	0,031	0,031	0,045
2	0,022	0,098	0,049
3	0,021	0,100	0,041
4	0,025	0,082	0,020
5	0,040	0,098	0,016
6	0,044	0,149	0,016
7	0,256	0,343	0,003
$\mu=0,25$			
t (h)	Etanoli (g/l)	Glyseroli (g/l)	Glukoosi (g/l)
0	0,002	0,623	0,014
0,5	0,030	0,000	0,183
1	0,054	1,124	0,112
1,5	0,022	0,088	0,058
2	0,022	1,190	0,054
2,5	0,037	1,380	0,053
3	0,030	1,552	0,034
3,5	0,032	1,499	0,023
4	0,086	1,477	0,028
4,5	0,151	0,397	0,018
5	0,311	1,675	0,017

$\mu=0,15$	Reaktori			Tulppavirta		
t	Etanoli (g/l)	Glyseroli (g/l)	Glukoosi (g/l)	Etanoli (g/l)	Glyseroli (g/l)	Glukoosi (g/l)
0	0,001	0,008	0,014	0,006	0,008	0,005
1	-0,001	0,009	0,048	0,055	0,009	0,587
2	0,010	0,019	0,040	0,080	0,024	0,671
3	0,021	0,003	0,024	0,148	0,029	0,351
4	0,054	0,038	0,035	0,115	0,057	0,558
5	0,009	0,050	0,034	0,257	0,069	0,332
6	0,013	0,058	0,012	0,198	0,060	0,967
7	0,018	0,070	0,022	0,158	0,027	0,549
8	0,024	0,086	0,020	0,246	0,042	0,538
$\mu=0,20$	Reaktori			Tulppavirta		
t	Etanoli (g/l)	Glyseroli (g/l)	Glukoosi (g/l)	Etanoli (g/l)	Glyseroli (g/l)	Glukoosi (g/l)
0	-0,001	0,123	0,008	-0,007	0,012	0,078
1	0,012	1,168	0,047	0,159	0,088	0,905
2	0,007	0,220	0,080	0,140	0,331	0,922
3	0,016	1,433	0,014	0,206	0,309	1,103
4	0,015	1,543	0,037	0,317	0,397	1,077
5	0,013	0,331	0,016	0,430	0,397	1,457
6	0,023	1,798	0,095	0,678	1,653	1,526
7	0,028	0,793	0,029	0,649	1,675	3,198
8	0,040	0,948	0,041	0,523	0,926	4,051
$\mu=0,25$	Reaktori			Tulppavirta		
t	Etanoli (g/l)	Glyseroli (g/l)	Glukoosi (g/l)	Etanoli (g/l)	Glyseroli (g/l)	Glukoosi (g/l)
0,0	0,002	0,110	0,015	0,288	0,011	0,000
0,5	0,022	1,344	0,217	0,110	1,102	1,508
1,0	0,128	0,154	0,122	0,121	0,198	1,388
1,5	0,094	0,287	0,083	-0,001	0,705	1,663
2,0	0,019	1,411	0,071	0,429	1,565	1,586
2,5	0,039	0,529	0,034	0,287	1,433	1,594
3,0	0,071	1,697	0,025	0,382	1,455	1,784
3,5	0,141	-0,075	0,028	0,335	1,300	1,663
4,0	0,306	2,746	0,025	0,376	1,940	1,663
4,5	0,448	2,014	0,028	0,908	1,146	3,051
5,0	0,077	1,080	0,013	1,457	2,327	4,163

A-stat-kasvatus ideaalisella sekoituksella					
t (h)	X (g)	$\mu$ (h <sup>-1</sup> ), asetus	S (g)	Etanoli (g/l)	Glukoosi (g/l)
0,0	87,6	0,15	0		
0,5	75,8	0,16	14	0,105	0,153
1,0	103,2	0,17	31,5	0,313	0,063
1,5	109,4	0,18	51,5	0,496	0,086
2,0	119,3	0,19	72,5	0,290	0,061
2,5	130,7	0,2	102	0,001	0,068
3,0	145,0	0,21	132,5	0,193	0,063
3,5	159,8	0,22	170	0,368	0,029
4,0	184,5	0,23	218,5	0,041	0,034
4,5	207,9	0,24	274,5	0,435	0,022
5,0	233,3	0,25	336	1,066	0,020

A-stat-kasvatus tulppavirtauksella			
t (h)	X (g)	$\mu$ (h <sup>-1</sup> ), asetus	S (g)
0,0	84,0	0,15	0
0,5	99,9	0,16	15,5
1,0	103,6	0,17	34,5
1,5	113,5	0,18	52
2,0	120,1	0,19	79
2,5	129,9	0,2	103
3,0	147,9	0,21	141,5
3,5	167,7	0,22	176
4,0	184,2	0,23	222
4,5	197,5	0,24	288,5
5,0	226,6	0,25	349,5

A-stat-kasvatus tulppavirtauksella			
Reaktori		Tulppavirtaus	
näyte	Glukoosi	näyte	Glukoosi
t (h)	g/l	t	g/l
0,0	0,011	0,0	
0,5	0,088	0,5	0,457
1,0	0,080	1,0	0,733
1,5	0,076	1,5	1,017
2,0	0,074	2,0	1,017
2,5	0,037	2,5	1,138
3,0	0,026	3,0	1,474
3,5	0,036	3,5	2,310
4,0	0,034	4,0	2,663
4,5	0,055	4,5	2,068
5,0	0,036	5,0	4,215

A-stat-kasvatus tulppavirtauksella			
Reaktori		Tulppavirtaus	
	Etanoli		Etanoli
t (h)	g/l	t (h)	g/l
0,0	0,04	0,0	
0,5	0,03	0,5	0,09
1,0	0,03	1,0	0,19
1,5	0,05	1,5	0,17
2,0	0,05	2,0	0,26
2,5	0,06	2,5	0,36
3,0	0,15	3,0	0,23
3,5	0,47	3,5	0,41
4,0	1,20	4,0	1,16
4,5	1,50	4,5	1,16
5,0	1,93	5,0	2,76

Online-mittaustulokset kasvatuksesta, jossa ideaalinen sekoitus ja  $\mu = 0,15 \text{ h}^{-1}$

Age (h)	CO2:Value	RQ:Value	PO2:Value	OUR:Value	SUBDC:Value	STIRR:Value
0,07	0,52	1,62	97,7	5,3	1	800
0,15	0,76	0,98	92,2	9,9	5	800
0,24	1,18	1,03	88,7	15,0	10	800
0,32	1,52	1,03	85,2	19,5	14	800
0,40	1,90	1,04	81,6	24,2	19	800
0,49	2,20	1,05	79,5	27,7	23	800
0,57	2,37	1,08	79,0	29,1	28	800
0,65	2,50	1,08	77,8	30,7	32	800
0,74	2,68	1,05	74,8	34,0	37	800
0,82	2,94	1,05	71,7	37,2	41	800
0,90	3,10	1,06	72,2	38,9	46	800
0,99	3,09	1,08	72,7	38,1	51	800
1,07	3,07	1,08	72,8	38,0	56	800
1,15	3,05	1,08	73,0	37,7	61	800
1,24	3,02	1,08	73,4	37,3	66	800
1,32	2,99	1,08	73,4	37,0	71	800
1,40	3,01	1,07	73,0	37,4	76	800
1,49	3,07	1,06	72,3	38,6	82	800
1,57	3,15	1,06	71,6	39,7	87	800
1,65	3,24	1,06	70,7	40,5	92	800
1,74	3,35	1,06	69,5	42,0	98	800
1,82	3,53	1,06	67,5	44,3	104	800
1,90	3,80	1,05	64,8	48,0	109	800
1,99	4,23	1,07	60,7	53,0	115	806
2,07	4,91	1,11	59,4	58,2	121	838
2,15	5,25	1,14	59,4	60,7	127	871
2,24	5,42	1,14	59,4	63,3	132	915
2,32	5,44	1,10	59,4	66,0	138	962
2,40	5,31	1,04	59,4	68,5	144	1007
2,49	5,19	0,98	59,5	70,5	151	1044
2,57	5,22	0,99	60,5	68,2	157	1006
2,65	4,69	1,09	61,2	58,1	163	817
2,74	4,09	1,06	64,8	51,3	169	800
2,82	3,74	1,05	67,0	47,7	176	800
2,90	3,68	1,03	66,7	47,5	182	800
2,99	3,80	1,03	65,1	48,8	189	800
3,07	3,92	1,04	64,5	49,9	195	800
3,15	3,99	1,04	63,5	50,9	202	800
3,24	4,09	1,04	62,8	52,3	209	800
3,32	4,16	1,04	62,4	53,2	216	800
3,40	4,23	1,04	61,4	54,0	223	800
3,49	4,29	1,05	61,5	54,2	230	800
3,57	4,31	1,05	60,7	54,8	237	800
3,65	4,48	1,04	59,5	57,5	244	823
3,74	4,67	1,04	60,2	59,8	252	842
3,82	4,69	1,04	59,7	59,9	259	844
3,90	4,84	1,04	59,8	61,4	267	880
3,99	4,92	1,06	60,1	61,8	274	879
4,07	4,97	1,04	59,4	63,6	282	906
4,15	5,23	1,03	59,5	67,5	290	964
4,24	5,37	1,04	60,3	68,9	298	971
4,32	5,31	1,04	59,7	68,0	306	968
4,40	5,71	1,00	58,8	75,3	314	1166
4,49	6,28	1,07	61,1	78,4	322	1126
4,57	5,56	1,06	60,2	70,9	331	996

4,65	5,47	1,01	59,4	72,4	339	1022
4,74	5,77	1,03	60,2	74,6	348	1086
4,82	5,73	1,05	60,2	72,7	357	1054
4,90	5,85	1,05	59,8	73,4	366	1114
4,99	5,85	1,06	60,2	74,0	374	1052
5,07	5,79	1,01	59,2	77,2	383	1111
5,15	6,41	1,02	60,6	82,7	393	1248
5,24	6,00	1,06	60,5	75,8	402	1086
5,32	6,00	1,04	59,5	75,6	411	1181
5,40	6,03	1,06	60,7	76,1	420	1086
5,49	5,84	1,03	59,8	76,0	430	1087
5,57	6,03	1,01	60,1	79,3	440	1139
5,65	6,10	1,02	60,1	79,1	449	1142
5,74	6,20	1,04	59,8	78,8	459	1194
5,82	6,31	1,05	59,7	80,0	469	1193
5,90	6,44	1,03	59,8	83,0	480	1230
5,99	6,58	1,01	59,8	87,0	490	1279
6,07	6,85	1,02	60,3	89,8	500	1365
6,15	6,85	1,04	59,7	87,5	511	1374
6,24	6,91	1,04	59,9	88,1	522	1383
6,32	7,05	1,02	58,9	90,7	532	1439
6,40	7,32	1,03	60,3	94,7	543	1478
6,49	7,19	1,02	59,8	94,5	554	1461
6,57	7,42	1,02	58,7	97,0	566	1496
6,65	7,35	1,04	59,3	93,6	577	1496
6,74	7,44	1,04	58,5	94,9	589	1500
6,82	7,61	1,03	58,1	98,2	600	1500
6,90	7,75	1,02	57,5	101,5	612	1500
6,99	7,80	1,01	56,9	102,3	624	1500
7,07	8,11	1,03	54,0	103,4	636	1500
7,15	8,10	1,05	55,8	102,8	649	1500
7,24	8,17	1,04	53,2	107,3	661	1499
7,32	8,44	1,03	54,2	110,6	674	1499
7,40	8,40	1,01	53,4	110,1	687	1500
7,49	8,39	1,02	53,4	109,4	700	1500
7,57	8,66	1,03	50,5	110,1	713	1500
7,65	8,72	1,05	51,6	110,9	726	1500
7,74	8,83	1,03	50,9	113,7	740	1500
7,82	8,84	1,01	50,4	118,2	753	1500
7,90	9,18	1,00	47,8	121,1	767	1500
7,99	9,19	1,04	48,1	117,1	781	1500

Online-mittaustulokset tulppavirtauskasvatuksesta, kun  $\mu = 0,15 \text{ h}^{-1}$ 

Age (h)	CO2:Value	RQ:Value	PO2:Value	OUR:Value	SUBDC:Value	STIRR:Value
0,08	0,38	1,96	100,2	3,6	2	800
0,16	0,78	0,92	91,8	10,9	6	800
0,25	1,28	1,01	88,4	16,4	10	800
0,33	1,58	1,07	85,9	19,7	14	800
0,41	1,86	1,07	82,9	23,1	18	800
0,50	2,15	1,07	80,1	26,6	22	800
0,58	2,32	1,09	79,3	28,3	26	800
0,66	2,37	1,10	79,6	28,7	31	800
0,75	2,36	1,11	80,2	28,2	35	798
0,83	2,39	1,09	79,1	29,1	39	800
0,91	2,51	1,07	76,7	31,2	44	801
1,00	2,69	1,07	75,1	33,4	48	800
1,08	2,80	1,08	75,0	34,3	53	800
1,16	2,84	1,09	74,7	34,6	58	800
1,25	2,89	1,09	73,8	35,5	62	800
1,33	2,96	1,09	73,2	36,4	67	801
1,41	3,01	1,08	72,7	37,0	72	800
1,50	3,06	1,07	72,2	37,9	77	800
1,58	3,14	1,08	71,4	38,8	82	799
1,66	3,22	1,08	70,4	39,8	87	799
1,75	3,34	1,08	69,1	41,3	92	799
1,83	3,46	1,08	67,9	42,8	97	801
1,91	3,59	1,07	66,7	44,3	102	800
2,00	3,70	1,08	65,6	45,6	107	800
2,08	3,79	1,08	64,9	46,5	113	800
2,16	3,87	1,08	63,7	47,7	118	801
2,25	3,97	1,08	62,8	48,9	124	800
2,33	4,04	1,07	61,9	50,0	129	800
2,41	4,15	1,08	60,7	51,3	135	800
2,50	4,24	1,08	59,9	52,1	140	800
2,58	4,31	1,08	59,5	53,0	146	807
2,66	4,39	1,08	59,6	54,2	152	820
2,75	4,46	1,07	59,6	55,2	158	832
2,83	4,51	1,07	59,5	55,9	164	842
2,91	4,56	1,07	59,5	56,4	170	852
3,00	4,61	1,07	59,7	57,1	176	860
3,08	4,64	1,07	59,6	57,8	182	867
3,16	4,67	1,07	60,1	58,0	188	876
3,25	4,70	1,06	59,6	58,7	195	888
3,33	4,76	1,07	59,6	59,1	201	893
3,41	4,80	1,07	59,5	59,7	207	900
3,50	4,84	1,06	59,6	60,7	214	911
3,58	4,91	1,06	59,6	61,5	221	920
3,66	4,94	1,06	59,5	61,9	228	928
3,75	4,98	1,06	59,5	62,2	235	934
3,83	5,03	1,06	59,5	63,2	242	942
3,91	5,08	1,06	59,7	64,0	249	955
4,00	5,13	1,05	59,6	64,8	256	963
4,08	5,19	1,06	59,5	65,4	263	969
4,16	5,23	1,06	59,4	65,8	270	987
4,25	5,28	1,06	59,8	66,5	277	1000

4,33	5,34	1,05	59,7	67,8	285	1016
4,41	5,41	1,05	59,7	68,6	292	1024
4,50	5,46	1,05	59,7	69,2	300	1035
4,58	5,52	1,05	59,6	69,7	307	1052
4,66	5,58	1,05	59,8	70,5	315	1063
4,75	5,64	1,05	59,9	71,7	323	1076
4,83	5,70	1,04	59,7	72,6	331	1086
4,91	5,76	1,04	59,6	73,3	339	1100
5,00	5,82	1,05	59,6	73,9	348	1113
5,08	5,88	1,05	59,7	74,6	356	1123
5,16	5,94	1,04	59,8	76,0	365	1141
5,25	6,02	1,04	59,6	77,1	373	1167
5,33	6,10	1,04	59,6	77,9	382	1186
5,41	6,18	1,04	59,5	78,7	390	1204
5,50	6,24	1,04	59,8	79,5	399	1219
5,58	6,32	1,04	59,6	80,9	408	1238
5,66	6,42	1,04	59,7	82,3	417	1271
5,75	6,49	1,04	59,6	83,0	427	1281
5,83	6,55	1,04	59,4	83,7	436	1301
5,91	6,64	1,04	59,5	84,6	446	1329
6,00	6,73	1,04	59,7	86,1	455	1360
6,08	6,83	1,03	59,9	87,6	465	1390
6,16	6,84	1,03	59,5	88,2	474	1418
6,25	6,97	1,04	59,4	89,2	484	1457
6,33	7,04	1,04	59,5	89,9	494	1485
6,41	7,12	1,04	59,3	91,2	505	1499
6,50	7,24	1,03	58,4	93,0	515	1500
6,58	7,36	1,03	57,7	94,5	525	1499
6,66	7,46	1,03	56,9	95,9	536	1499
6,75	7,54	1,04	56,4	96,6	547	1497
6,83	7,62	1,04	55,8	97,8	558	1499
6,91	7,73	1,03	55,1	99,7	569	1497
7,00	7,84	1,03	54,4	101,1	580	1502
7,08	7,93	1,03	53,8	102,0	591	1503
7,16	7,97	1,04	53,5	101,7	602	1500
7,25	8,08	1,03	52,6	103,6	614	1500
7,33	8,19	1,03	51,9	105,5	626	1500
7,41	8,33	1,03	51,0	107,5	638	1499
7,50	8,43	1,03	50,4	108,6	650	1498
7,58	8,52	1,04	49,8	109,2	662	1503
7,66	8,62	1,04	49,1	110,3	674	1500
7,75	8,74	1,03	48,5	112,2	687	1500
7,83	8,87	1,03	47,5	114,4	699	1500
7,91	8,99	1,03	46,8	115,9	712	1500
8,00	9,07	1,04	46,1	116,4	725	1500



Online-mittaustulokset kasvatuksesta, jossa ideaalinen sekoitus ja  $\mu = 0,20 \text{ h}^{-1}$

Age (h)	CO2:Value	RQ:Value	PO2:Value	OUR:Value	SUBDC:Value	STIRR:Value
0,08	0,73	0,87	88,1	11,5	2	800
0,16	1,70	0,88	75,8	25,5	7	800
0,25	3,00	0,95	64,6	41,2	13	801
0,33	3,79	1,01	59,8	49,3	20	812
0,41	4,14	1,03	59,3	53,6	26	859
0,50	4,42	1,03	59,4	56,7	32	907
0,58	4,58	1,04	59,7	58,3	38	922
0,66	4,67	1,04	59,4	59,9	45	956
0,75	4,90	1,05	59,4	62,2	52	996
0,83	5,00	1,05	59,5	63,3	58	1005
0,91	5,17	1,05	59,1	65,8	65	1076
1,00	5,74	1,07	59,4	70,8	72	1175
1,08	6,00	1,08	59,4	73,6	79	1211
1,16	6,20	1,09	59,4	75,6	86	1247
1,25	6,43	1,10	59,4	78,0	94	1305
1,33	6,46	1,07	59,3	80,7	101	1373
1,41	6,37	1,03	59,3	82,7	109	1427
1,50	6,43	1,03	60,5	82,4	116	1416
1,58	5,81	1,08	60,9	71,5	124	1131
1,66	5,34	1,06	60,6	67,5	132	1071
1,75	5,16	1,06	60,4	65,1	140	1026
1,83	5,14	1,04	59,7	65,5	149	1047
1,91	5,54	1,04	59,9	70,8	157	1144
2,00	5,73	1,04	59,6	73,5	165	1158
2,08	6,02	1,02	59,2	78,6	174	1284
2,16	6,26	1,06	60,2	78,5	183	1295
2,25	6,28	1,05	59,2	79,7	192	1336
2,33	6,71	1,04	60,0	85,2	201	1478
2,41	6,72	1,03	59,6	87,0	210	1463
2,50	7,02	1,03	57,5	91,3	220	1497
2,58	7,21	1,04	57,5	91,7	229	1500
2,66	7,35	1,05	56,1	93,1	239	1500
2,75	7,55	1,05	55,7	94,7	249	1497
2,83	7,64	1,04	54,5	97,6	259	1499
2,91	7,77	1,04	54,1	99,7	269	1500
3,00	7,84	1,03	53,0	101,4	279	1500
3,08	7,94	1,05	53,3	100,5	289	1500
3,16	7,99	1,05	52,5	101,3	300	1500
3,25	8,08	1,05	52,7	102,3	311	1500
3,33	8,20	1,03	51,2	106,0	322	1500
3,41	8,29	1,03	51,3	107,1	333	1500
3,50	8,46	1,03	49,3	109,1	345	1500
3,58	8,59	1,05	49,9	108,0	357	1500
3,66	8,68	1,04	48,4	111,3	368	1500
3,75	8,88	1,03	47,6	114,5	380	1500
3,83	9,05	1,02	45,6	118,7	393	1500
3,91	9,09	1,02	44,8	119,1	405	1500
4,00	9,11	1,00	43,5	120,3	418	1500
4,08	9,14	0,98	42,7	123,4	431	1500
4,16	9,13	0,96	41,6	126,1	444	1500
4,25	9,11	0,93	40,1	129,7	457	1500
4,33	9,10	0,92	39,0	131,1	471	1500
4,41	9,09	0,93	38,5	131,0	484	1500
4,50	9,13	0,91	37,3	133,6	498	1500
4,58	9,11	0,89	36,5	136,9	513	1500

4,66	9,10	0,87	35,2	140,0	527	1500
4,75	9,13	0,85	34,1	142,3	542	1500
4,83	9,11	0,85	33,2	142,7	557	1500
4,91	9,13	0,84	32,6	143,5	572	1500
5,00	9,13	0,82	31,0	148,6	588	1500
5,08	9,12	0,80	29,6	152,4	603	1500
5,16	9,15	0,79	28,6	153,4	620	1500
5,25	9,11	0,78	27,4	154,6	636	1500
5,33	9,15	0,77	25,9	158,4	652	1500
5,41	9,13	0,75	24,2	162,8	669	1500
5,50	9,15	0,74	23,1	165,5	686	1500
5,58	9,17	0,73	22,2	166,9	703	1500
5,66	9,15	0,72	21,0	168,6	721	1500
5,75	9,17	0,71	19,6	171,9	739	1499
5,83	9,19	0,70	18,2	175,1	757	1500
5,91	9,20	0,69	17,9	182,9	776	1500
6,00	9,19	0,73	21,4	192,3	795	1500
6,08	9,18	0,75	22,9	188,7	814	1500
6,16	9,16	0,76	22,5	189,0	833	1500
6,25	9,15	0,75	21,5	191,3	853	1500
6,33	9,15	0,74	20,2	194,9	873	1500
6,41	9,19	0,73	19,2	197,7	894	1500
6,50	9,19	0,72	18,1	200,0	914	1500
6,58	9,20	0,70	16,3	204,2	936	1500
6,66	9,19	0,69	15,1	207,1	957	1500
6,75	9,20	0,69	14,6	208,3	979	1500

Online-mittaustulokset tulppavirtauskasvatuksesta, kun  $\mu = 0,20 \text{ h}^{-1}$

Age (h)	CO2:Value	RQ:Value	PO2:Value	OUR:Value	SUBDC:Value	STIRR:Value
0,06	0,29	1,92	97,5	3,1	2	800
0,14	0,66	0,88	90,1	9,3	6	800
0,22	1,47	0,92	82,4	20,6	12	800
0,31	2,16	0,98	77,2	28,9	17	800
0,39	2,60	1,02	74,0	33,9	23	800
0,47	2,94	1,04	71,3	37,4	29	800
0,56	3,10	1,06	71,2	38,8	35	800
0,64	3,08	1,07	72,0	38,3	41	800
0,72	3,04	1,05	71,3	38,4	47	800
0,81	3,15	1,05	69,8	40,1	53	800
0,89	3,29	1,05	69,1	41,7	59	800
0,97	3,35	1,06	69,4	42,0	65	800
1,06	3,41	1,07	68,7	42,6	71	800
1,14	3,53	1,06	67,3	44,3	78	800
1,22	3,67	1,05	66,3	46,2	85	800
1,31	3,79	1,05	65,0	48,0	91	800
1,39	4,02	1,06	62,7	50,5	98	800
1,47	4,21	1,06	61,4	52,8	105	800
1,56	4,33	1,06	60,7	54,2	112	800
1,64	4,50	1,06	59,5	56,5	119	819
1,72	4,70	1,06	59,5	58,8	127	843
1,81	4,82	1,07	59,5	60,2	134	862
1,89	5,03	1,06	59,5	62,7	142	911
1,97	5,17	1,06	59,6	64,8	150	929
2,06	5,28	1,06	59,4	66,2	158	955
2,14	5,44	1,07	59,7	67,6	166	994
2,22	5,50	1,07	59,7	68,5	174	1005
2,31	5,60	1,06	59,5	70,2	182	1037
2,39	5,68	1,06	60,1	71,1	190	1053
2,47	5,68	1,06	60,1	70,9	199	1056
2,56	5,76	1,06	59,8	71,6	207	1080
2,64	5,80	1,06	59,9	72,6	216	1086
2,72	5,90	1,06	59,5	74,2	225	1112
2,81	5,99	1,06	60,0	75,3	234	1127
2,89	6,04	1,06	59,4	76,2	244	1138
2,97	6,14	1,06	59,9	77,3	253	1191
3,06	6,16	1,05	60,0	77,9	263	1189
3,14	6,29	1,05	59,4	79,7	273	1221
3,22	6,43	1,04	59,9	81,8	283	1254
3,31	6,52	1,05	59,7	82,8	293	1292
3,39	6,60	1,05	59,6	83,5	303	1302
3,47	6,73	1,05	59,5	85,2	313	1365
3,56	6,85	1,04	59,7	87,4	324	1392
3,64	6,99	1,04	59,4	89,4	334	1435
3,72	7,11	1,04	59,7	90,8	345	1474
3,81	7,22	1,05	59,3	91,3	356	1498
3,89	7,29	1,04	58,8	92,7	368	1500
3,97	7,41	1,04	58,1	94,7	379	1500
4,06	7,44	1,04	58,1	96,3	391	1498
4,14	7,57	1,04	57,2	96,8	403	1502
4,22	7,66	1,05	56,5	97,6	415	1502
4,31	7,80	1,04	55,7	99,5	428	1498
4,39	7,93	1,04	54,9	101,7	440	1498
4,47	8,10	1,04	54,5	103,8	453	1500
4,56	8,24	1,04	53,3	104,6	465	1500

4,64	8,34	1,04	52,5	106,2	479	1500
4,72	8,52	1,04	51,6	108,8	492	1500
4,81	8,69	1,04	50,7	111,3	506	1498
4,89	8,79	1,04	50,1	113,5	520	1498
4,97	8,95	1,04	49,1	114,2	534	1502
5,06	9,03	1,04	48,4	114,8	548	1502
5,14	9,05	1,01	47,2	118,3	563	1502
5,22	9,07	0,97	46,4	121,9	577	1504
5,31	9,07	0,96	45,4	122,6	592	1502
5,39	9,06	0,95	44,3	123,8	608	1500
5,47	9,07	0,95	43,5	126,2	623	1500
5,56	9,10	0,94	42,7	128,9	639	1500
5,64	9,11	0,91	41,6	131,3	655	1502
5,72	9,09	0,91	40,7	132,7	671	1504
5,81	9,10	0,90	39,5	134,2	688	1502
5,89	9,08	0,88	38,7	137,1	705	1499
5,97	9,07	0,85	37,8	140,5	722	1498
6,06	9,11	0,85	37,3	142,4	740	1500
6,14	9,08	0,85	35,7	143,3	757	1502
6,22	9,10	0,83	34,4	146,1	775	1502
6,31	9,11	0,81	33,8	150,4	794	1500
6,39	9,12	0,80	33,6	152,3	812	1500
6,47	9,13	0,79	32,6	152,4	831	1500
6,56	9,09	0,77	31,4	155,0	850	1500
6,64	9,09	0,76	30,7	159,2	870	1500
6,72	9,14	0,75	29,8	162,5	890	1498
6,81	9,09	0,73	28,6	164,3	910	1498
6,89	9,12	0,73	27,7	165,5	931	1500
6,97	9,13	0,72	26,6	169,7	952	1500
7,06	9,13	0,70	26,2	173,9	973	1500
7,14	9,14	0,69	24,7	175,1	994	1498
7,22	9,15	0,69	23,4	176,8	1017	1498
7,31	9,15	0,68	22,7	180,2	1039	1500
7,39	9,13	0,66	21,8	183,8	1062	1500
7,47	9,14	0,65	20,8	185,8	1085	1500
7,56	9,14	0,65	19,6	187,9	1108	1498
7,64	9,15	0,64	18,6	190,7	1132	1498
7,72	9,15	0,63	17,9	193,0	1157	1498
7,81	9,17	0,62	16,9	194,2	1182	1498
7,89	9,15	0,62	16,1	194,8	1207	1500

Online-mittaustulokset kasvatuksesta, jossa ideaalinen sekoitus ja  $\mu = 0,25 \text{ h}^{-1}$

Age (h)	CO2:Value	RQ:Value	PO2:Value	OUR:Value	SUBDC:Value	STIRR:Value
0,08	0,46	1,11	100,7	8,7	4	799
0,16	1,25	0,81	88,2	19,9	12	799
0,24	2,46	0,89	73,6	36,1	19	801
0,33	3,64	0,97	63,0	49,2	26	801
0,41	4,32	1,02	59,9	55,6	34	806
0,49	4,54	1,03	59,4	58,7	41	838
0,58	4,97	1,02	59,3	64,8	49	957
0,66	5,36	1,03	59,7	68,8	57	991
0,74	5,43	1,03	59,7	69,9	66	1001
0,83	5,56	1,04	59,5	71,0	74	1016
0,91	5,69	1,04	59,4	72,7	83	1045
0,99	6,08	1,06	59,4	76,1	92	1118
1,08	6,43	1,08	59,4	78,8	101	1156
1,16	6,67	1,09	59,4	81,2	110	1194
1,24	6,83	1,09	59,4	83,8	119	1243
1,33	6,83	1,05	59,4	86,2	129	1293
1,41	6,74	1,01	59,4	88,4	139	1344
1,49	6,72	0,99	59,4	90,5	149	1392
1,58	6,82	0,99	59,5	92,1	159	1425
1,66	6,90	1,03	60,8	87,4	169	1344
1,74	6,25	1,05	60,6	80,5	179	1159
1,83	6,08	1,03	59,8	78,6	190	1132
1,91	6,13	1,02	59,7	80,2	201	1151
1,99	6,37	1,02	59,5	82,4	212	1223
2,08	6,85	1,03	59,6	88,3	224	1376
2,16	7,22	1,02	59,2	94,5	236	1461
2,24	7,58	1,03	58,5	98,1	248	1501
2,33	7,81	1,04	57,0	100,5	260	1500
2,41	8,08	1,04	55,4	102,9	272	1500
2,49	8,30	1,04	54,1	105,5	285	1500
2,58	8,54	1,05	53,0	107,8	298	1500
2,66	8,76	1,06	51,6	110,4	312	1500
2,74	8,99	1,06	50,0	113,0	325	1500
2,83	9,12	1,04	48,4	115,9	339	1498
2,91	9,19	1,03	46,8	118,9	353	1499
2,99	9,17	1,01	45,6	121,5	368	1500
3,08	9,13	0,99	44,7	123,0	382	1502
3,16	9,18	0,99	44,2	124,1	398	1501
3,24	9,16	0,99	45,5	122,5	413	1498
3,33	9,15	0,99	45,6	123,4	429	1496
3,41	9,18	0,98	44,1	125,1	445	1496
3,49	9,17	0,94	41,5	128,5	461	1498
3,58	9,18	0,91	39,4	133,3	478	1500
3,66	9,14	0,89	38,2	136,4	495	1500
3,74	9,15	0,88	36,8	138,1	512	1498
3,83	9,16	0,87	35,4	140,5	530	1499
3,91	9,18	0,85	33,7	143,4	549	1500
3,99	9,19	0,83	32,3	146,7	567	1500
4,08	9,17	0,82	30,8	149,0	586	1500
4,16	9,18	0,80	29,3	151,3	605	1497
4,24	9,18	0,79	28,3	154,7	625	1498
4,33	9,14	0,77	27,2	158,2	645	1502
4,41	9,16	0,76	25,7	161,3	666	1501
4,49	9,17	0,75	24,2	164,0	687	1500
4,58	9,17	0,74	22,7	166,7	709	1502

4,66	9,16	0,72	21,4	169,8	730	1501
4,74	9,17	0,71	20,0	172,4	753	1500
4,83	9,18	0,70	18,7	174,7	776	1498
4,91	9,18	0,69	17,5	177,0	799	1501
4,99	9,20	0,68	16,6	179,3	823	1501

Online-mittaustulokset tulppavirtauskasvatuksesta, kun  $\mu = 0,25 \text{ h}^{-1}$

Age (h)	CO2:Value	RQ:Value	PO2:Value	OUR:Value	SUBDC:Value	STIRR:Value
0,08	0,51	1,76	98,1	5,0	6	800
0,16	1,37	0,98	82,7	18,2	14	800
0,25	2,54	0,99	67,9	33,3	22	802
0,33	3,73	1,00	59,4	48,8	30	921
0,41	4,49	1,06	59,3	56,0	38	992
0,50	4,86	1,08	59,3	59,7	46	1051
0,58	5,27	1,09	59,4	64,3	55	1116
0,66	5,66	1,12	59,5	67,0	63	1144
0,75	5,96	1,15	59,5	68,8	72	1165
0,83	6,18	1,16	59,4	70,6	81	1198
0,91	6,33	1,16	59,4	72,5	90	1236
1,00	6,35	1,13	59,4	74,6	100	1272
1,08	6,34	1,10	59,4	76,4	109	1308
1,16	6,37	1,08	59,4	78,0	119	1339
1,25	6,44	1,07	59,4	79,7	129	1376
1,33	6,52	1,06	59,4	81,6	139	1412
1,41	6,61	1,05	59,4	83,4	149	1450
1,50	6,71	1,04	59,4	85,5	160	1492
1,58	6,83	1,04	58,8	87,2	171	1500
1,66	6,90	1,04	58,1	88,3	182	1500
1,75	7,04	1,04	57,3	89,9	193	1499
1,83	7,17	1,04	56,5	91,6	205	1500
1,91	7,30	1,04	55,5	93,3	216	1500
2,00	7,48	1,05	55,0	94,8	228	1500
2,08	7,63	1,06	54,7	95,9	241	1500
2,16	7,73	1,06	54,4	96,4	253	1499
2,25	7,83	1,06	54,1	98,0	266	1500
2,33	7,97	1,07	53,9	99,6	279	1500
2,41	8,14	1,07	53,4	101,1	292	1500
2,50	8,29	1,07	52,8	102,9	306	1500
2,58	8,47	1,06	52,1	105,6	320	1500
2,66	8,60	1,05	48,0	109,2	334	1500
2,75	8,81	1,08	47,4	108,9	348	1499
2,83	8,99	1,08	46,2	110,5	363	1500
2,91	9,10	1,08	45,0	112,6	378	1500
3,00	9,16	1,07	43,8	115,0	393	1500
3,08	9,12	1,04	42,7	117,6	409	1500
3,16	9,15	1,02	41,8	119,3	425	1500
3,25	9,15	1,01	40,4	121,5	441	1500
3,33	9,15	0,99	39,1	123,7	458	1500
3,41	9,16	0,97	37,8	126,5	475	1500
3,50	9,19	0,95	36,5	129,3	493	1500
3,58	9,16	0,93	35,1	131,2	511	1500
3,66	9,17	0,91	34,1	133,2	529	1500
3,75	9,16	0,90	32,9	135,6	548	1500
3,83	9,15	0,89	31,5	138,2	566	1500
3,91	9,17	0,87	30,0	140,5	586	1500
4,00	9,18	0,85	28,7	142,8	606	1500
4,08	9,17	0,83	27,6	145,5	626	1500
4,16	9,16	0,82	26,6	147,1	647	1500
4,25	9,16	0,82	25,3	149,6	668	1500
4,33	9,15	0,80	24,0	151,7	689	1500
4,41	9,18	0,79	22,7	154,2	711	1500
4,50	9,20	0,78	21,3	157,2	733	1500
4,58	9,17	0,77	20,0	159,3	756	1500

4,66	9,18	0,76	19,0	161,0	779	1500
4,75	9,18	0,75	17,9	163,4	803	1500
4,83	9,16	0,74	16,7	166,2	828	1500
4,91	9,17	0,72	15,4	168,4	853	1500
5,00	9,17	0,72	14,4	170,1	878	1500



## Online-ittaustulokset astat-kasvatuksesta

Age (h)	CO2:Value	RQ:Value	PO2:Value	OUR:Value	SUBDC:Value	STIRR:Value
0,08	0,33	0,62	94,6	7,1	2	800
0,16	0,54	0,61	90,3	11,4	6	801
0,25	0,97	0,73	85,4	17,6	11	801
0,33	1,48	0,80	80,1	24,2	15	800
0,41	1,92	0,86	76,4	29,3	20	800
0,50	2,17	0,89	74,2	32,6	25	800
0,58	2,43	0,91	71,6	35,4	30	800
0,66	2,65	0,93	70,3	37,4	36	800
0,75	2,83	0,91	66,0	41,7	41	801
0,83	3,21	0,91	63,0	46,3	47	799
0,91	3,38	0,94	63,0	47,7	53	798
1,00	3,42	0,96	63,4	47,5	58	799
1,08	3,32	0,96	64,8	46,1	65	800
1,16	3,32	0,94	63,5	46,6	71	800
1,25	3,49	0,94	61,6	49,2	77	802
1,33	3,78	0,94	59,3	54,0	84	850
1,41	4,48	0,97	59,2	60,8	90	989
1,50	5,01	1,02	59,3	65,1	97	1076
1,58	5,41	1,06	59,3	67,3	104	1164
1,66	5,70	1,08	59,3	69,8	111	1241
1,75	5,74	1,05	59,3	72,7	118	1334
1,83	5,64	1,00	59,3	75,1	126	1421
1,91	5,56	0,96	59,2	77,1	133	1488
2,00	5,63	0,94	58,7	79,0	141	1504
2,08	5,71	0,94	58,1	80,7	150	1501
2,16	5,81	0,94	57,5	82,6	158	1499
2,25	5,95	0,94	57,3	84,2	167	1499
2,33	6,07	0,97	59,1	82,5	176	1483
2,41	5,74	0,98	60,6	78,9	185	1361
2,50	5,74	0,98	60,3	77,7	195	1353
2,58	5,86	0,98	59,5	79,3	205	1363
2,66	6,20	0,98	58,3	84,5	215	1484
2,75	6,54	0,98	56,9	89,3	225	1500
2,83	6,87	0,99	54,9	92,6	236	1500
2,91	7,18	1,00	53,0	95,3	246	1500
3,00	7,47	1,01	51,1	97,4	258	1500
3,08	7,85	1,04	48,9	99,3	269	1498
3,16	8,14	1,06	47,1	101,9	282	1499
3,25	8,33	1,06	45,6	104,9	294	1500
3,33	8,47	1,04	44,2	107,8	306	1500
3,41	8,56	1,03	42,9	110,6	320	1500
3,50	8,72	1,02	41,7	113,2	334	1500
3,58	8,93	1,02	40,5	115,9	348	1500
3,66	9,09	1,01	39,2	118,8	362	1500
3,75	9,16	1,00	37,9	121,7	377	1500
3,83	9,15	0,98	36,5	124,4	393	1500
3,91	9,16	0,96	35,2	127,0	409	1500
4,00	9,16	0,94	33,7	129,7	425	1500
4,08	9,19	0,93	32,6	132,1	443	1500
4,16	9,17	0,90	31,4	134,6	460	1500
4,25	9,15	0,89	30,2	137,1	479	1500

4,33	9,15	0,87	29,0	139,4	497	1500
4,41	9,16	0,86	27,7	141,7	517	1500
4,50	9,20	0,84	26,5	144,4	538	1500
4,58	9,18	0,83	25,4	146,8	558	1500
4,66	9,19	0,82	24,2	149,4	580	1500
4,75	9,18	0,80	23,1	151,9	602	1500
4,83	9,19	0,79	21,8	154,5	626	1500
4,91	9,18	0,78	20,6	157,4	650	1500
5,00	9,19	0,77	19,5	159,9	675	1500
5,08	9,19	0,75	18,6	162,3	701	1500

## Online-mittaustulokset a-stat-kasvatuksesta tulppavirtauksella

Age (h)	CO2:Value	RQ:Value	PO2:Value	OUR:Value	SUBDC:Value	STIRR:Value
0,08	0,63	1,56	87,6	7,0	4	801
0,16	1,27	0,94	78,0	17,1	9	802
0,25	1,94	1,03	72,0	24,6	14	801
0,33	2,33	1,07	69,7	28,5	19	800
0,41	2,42	1,08	69,0	29,9	24	801
0,50	2,55	1,09	67,7	31,2	29	801
0,58	2,64	1,10	67,2	31,8	34	800
0,66	2,68	1,07	65,9	33,3	40	800
0,75	2,88	1,06	63,3	36,1	45	801
0,83	3,07	1,08	62,5	37,8	51	802
0,91	3,17	1,09	61,7	38,8	57	802
1,00	3,30	1,08	60,2	40,5	63	801
1,08	3,42	1,08	59,5	42,1	69	813
1,16	3,58	1,07	59,3	44,4	75	863
1,25	3,83	1,07	59,3	47,5	82	923
1,33	4,13	1,08	59,3	50,9	88	991
1,41	4,36	1,08	59,4	53,4	95	1035
1,50	4,63	1,08	59,4	56,6	102	1102
1,58	4,79	1,08	59,3	58,8	109	1129
1,66	5,03	1,09	59,4	61,4	116	1204
1,75	5,21	1,09	59,3	63,7	124	1241
1,83	5,40	1,10	59,3	65,6	131	1310
1,91	5,58	1,10	59,3	67,6	139	1368
2,00	5,79	1,10	59,4	69,6	147	1435
2,08	5,97	1,10	59,2	72,0	156	1496
2,16	6,06	1,09	58,5	73,8	164	1504
2,25	6,13	1,08	57,5	75,6	173	1499
2,33	6,22	1,07	56,7	77,4	183	1499
2,41	6,32	1,06	56,0	79,2	192	1502
2,50	6,42	1,06	55,3	80,8	202	1501
2,58	6,49	1,06	55,1	81,7	212	1500
2,66	6,57	1,06	55,1	82,5	222	1498
2,75	6,72	1,06	54,3	84,2	232	1501
2,83	6,90	1,07	53,2	86,2	243	1499
2,91	7,10	1,07	51,8	88,3	254	1501
3,00	7,31	1,07	50,5	90,2	266	1501
3,08	7,46	1,08	49,5	91,5	278	1500
3,16	7,71	1,10	48,5	93,2	290	1500
3,25	7,98	1,11	47,3	95,4	303	1500
3,33	8,20	1,12	46,2	97,5	316	1502
3,41	8,39	1,12	45,1	99,6	329	1501
3,50	8,64	1,12	44,0	101,8	343	1502
3,58	8,79	1,12	43,1	103,7	358	1501
3,66	9,01	1,13	42,2	105,6	373	1500
3,75	9,14	1,13	41,1	108,1	388	1500
3,83	9,14	1,09	40,0	110,5	404	1500
3,91	9,13	1,07	38,9	112,7	420	1500
4,00	9,11	1,05	37,8	115,1	437	1500
4,08	9,14	1,04	37,0	117,0	454	1500
4,16	9,15	1,02	35,9	119,0	473	1500
4,25	9,14	0,99	34,8	121,4	491	1500

4,33	9,17	0,99	33,7	123,6	510	1500
4,41	9,16	0,97	32,6	125,7	530	1500
4,50	9,13	0,95	31,5	128,0	551	1500
4,58	9,17	0,93	30,5	130,3	572	1500
4,66	9,19	0,92	29,8	132,3	594	1500
4,75	9,19	0,91	28,9	133,9	617	1502
4,83	9,20	0,90	27,9	136,0	641	1501
4,91	9,17	0,89	26,9	138,4	666	1500
5,00	9,18	0,87	25,9	140,9	691	1502